

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der
Freien Universität Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN REKONSTRUIERTEN KOLLAGENFIBRILLEN AUS DER
SÄURELÖSLICHEN KOLLAGENFRAKTION

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Olaf Knuth

aus Berlin

1967

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der
Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an rekonstruierten
Kollagenfibrillen aus der säurelöslichen Kollagenfraktion.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Olaf Knuth

aus Berlin - 1967

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. Witt

Referent: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z

Korreferent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.**

Promoviert am: 31. 1. 1967

Einleitung: Ergebnisse der Kollagenforschung unter besonderer Berücksichtigung der Morphologie der Kollagenfibrille.
Problemstellung.

Material und Methoden: Untersuchung der nach Aussalzung durch Natriumchlorid aus der säurelöslichen Kollagenfraktion rekonstruierten Kollagenfibrillen vom Kalb.
Kontrastierung durch Uranylazetat, Phosphorwolframsäure, Osmiumsäure und Palladiumschrägbedampfung.
Versilberungsmethode nach Gömöri.

Befunde: Beziehung zwischen Rekonstruktionsdauer und der Fibrillendicke sowie der Fibrillenperiode.
Veränderung nach Formalinfixation.
Einfluß von Acetylcholin und Adrenalin auf die Fibrillenbildung.
Berechnung von Durchschnitt, Standardabweichung, Vertrauensgrenze und statistisch gesichertem Unterschied.
Versilberungsmodus nativer und rekonstruierter Kollagenfibrillen.

Diskussion

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Kurven und Abbildungen

Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0099

Einleitung

Alle Arten des Bindegewebes, das aus Zellen und Interzellulärsubstanz (ground-substance) besteht, bilden sich aus dem vom Mesoderm hervorgegangenen Mesenchym. In der klassischen Abhandlung über das Bindegewebe von A. Maximow (1927) in Möllendorffs Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen stand die Beschreibung der Zellen im Vordergrund. In den letzten Jahrzehnten hat sich dagegen das Interesse den beiden Bestandteilen der Grundsubstanz zugewandt. Es sind das die kollagenen Fibrillen und eine zwischen diesen Fibrillen gelegene lichtmikroskopisch amorphe Kittsubstanz (cementing-substance). Diese Entwicklung wurde einerseits durch Ergebnisse in der Biochemie gefördert und andererseits durch Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Forschung, wobei das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes um etwa das Hundertfache übertroffen wird und dadurch bisher bekannte lichtmikroskopische Strukturen kontinuierlich in makromolekulare Einheiten von großer funktioneller Bedeutung bis zu rund $10 \text{ \AA}$ Größe aufgelöst werden. Die Grenze zwischen Morphologie und Chemie schwindet langsam (O. Hertwig 1916). Diese neu gefundenen Tatsachen gestatten einen fortschreitenden Einblick in die Funktion des Bindegewebes.

Nach den morphologischen (lichtmikroskopischen), physikalischen und chemischen Eigenschaften gibt es drei Arten von Bindegewebsfasern, nämlich kollagene, retikuläre und elastische. Die Hauptmasse der geformten Interzellulärsubstanz in den Fasern des lockeren Bindegewebes, in Sehnen, im Knorpel und Knochen besteht aus Kollagenfibrillen.

Lichtmikroskopisch sind die nativen Kollagenfasern (Durchmesser $1 - 12 \mu$) ohne histologische Färbung nach van Gieson

weißlich glänzend, von elliptischem Querschnitt und unbestimmbarer Länge. Die Anordnung und Verteilung im Körper sind den lokal verschiedenen Zugbeanspruchungen angepaßt. Sie bilden Maschengitter, in dem die Fasern zwischen den Möglichkeiten des annähernden Parallelverlaufs und der rechtwinkligen Kreuzung pendeln. Ihre Dicke ist abhängig von der Anzahl der parallel angeordneten, unverzweigten, submikroskopischen kollagenen Fibrillen (Durchmesser $0,02 - 0,3\mu$), die jede Kollagenfaser zusammensetzen (Schwarz 1955a) und durch Behandlung mit Pikrinsäure, Kalk- oder Barytwasser unter Auflösung der Kittsubstanz isoliert werden. Sie zeichnen sich durch geringe Biegezugfestigkeit sowie starke Zugfestigkeit aus und besitzen einen hohen Elastizitätsmodul. Bei maximaler Zugbeanspruchung werden sie nur um etwa 5% ihrer Länge gedehnt. Vor dem Zerreißen beginnt aber das sogenannte "Fließen", eine zunehmend stärker werdende irreversible Längenausdehnung. In Wasser, Säuren oder Alkalien kommt es zu starker reversibler Wasseraufnahme, d.h. Quellung der nativen Fibrillen. Die gequollenen Fibrillenbündel lassen häufig ringartige Einschnürungen erkennen, die durch zarte elastische Membranen verursacht werden. Unter dem Polarisationsmikroskop zeigen die kollagenen Fibrillen eine charakteristische positive Doppelbrechung, die bei Dehnung der Fibrillen sich verstärkt und beim Trocknen abnimmt. Durch Erwärmung auf 62°C läßt sich eine starke Kontraktion bis zu 40% auslösen (Banga et al. 1954, Verzár 1955), wobei die Doppelbrechung sogar irreversibel verschwindet (Bucher 1962, Bargmann 1964). Mit der Erkennung der dicksten kollagenen Fibrillen ist das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes erreicht. Nur die Elektronenmikroskopie ermöglicht auch die Erkennung der

übrigen Fibrillen. Deshalb wurden diese Struktureinheiten von Wassermann (1956) als Mikrofibrillen (Durchmesser 20 - 200 μ) bezeichnet. Sie stellen das wesentliche Bauelement des Bindegewebes dar.

Der Durchmesser der Mikrofibrillen schwankt bei allen Wirbeltieren erheblich je nach Organ und Alter; er ist aber innerhalb eines bestimmten Gewebes bemerkenswert einheitlich (Schwarz 1953, 1957). Messungen an Haut- und Sehnenfibrillen ergaben für die meisten Vertebraten einen Wert von 60 bis 130 μ (Linke 1955, Harkness 1961). Die kleinsten Mikrofibrillen findet man im lockeren Bindegewebe mit einem Durchmesser von 20 bis 50 μ (Wassermann 1951) und in der Cornea mit 25 bis 33 μ (Schwarz 1952, 1953).

In der Lichtmikroskopie werden die Bindegewebsfasern in Kollagenfasern und Retikulinfasern unterteilt. Die sicherste Methode zur Unterscheidung ist die Bindegewebsversilberung nach Gömöri (1937). Dabei werden kollagene Fasern, wie sie z.B. in Sehnen vorkommen, braun oder rötlich und die Retikulinfasern z.B. im Interstitium schwarz. Elektronenmikroskopisch findet sich eine differente Silbergranulaverteilung. In den kollagenen Sehnenfibrillen liegen die Silbergranula in den D-Teilen (Innenversilberung der Fibrillen); dagegen ordnen sich die Silbergranula in den Retikulinfasern an der Oberfläche der Fibrillen meistens in Gruppen um den D-Teil an (regelmäßige Außenversilberung der Fibrillen). In embryonalen Bindegewebsformen lagern sich die Silbergranula der Fibrillenoberfläche ganz unregelmäßig an (unregelmäßige Außenversilberung der Fibrillen) (Schwarz 1955a, 1957, 1959, 1960). Eine der ersten Entdeckungen mit dem Elektronenmikroskop, die etwa gleichzeitig Schmitt, Hall und Jakus (1942, 1945) in

Amerika und Wolpers (1943, 1944) in Deutschland gelang, war der Nachweis, daß die nativen und formolfixierten Mikro-fibrillen durch eine charakteristische, periodische Querstreifung, d.h. durch das regelmäßige Alternieren von je einem dunklen, formstabilen, 30-60 m μ breiten (A-band oder D-Teil) und einem hellen, dehnbaren, 15-50 m μ breiten Abschnitt (B-band oder H-Teil), senkrecht zur Längsachse ausgezeichnet sind. Nach Wolpers (1944, 1948) ist der D-Teil nicht gleichmäßig gebaut, sondern läßt stets eine Aufteilung erkennen, die nach Einwirkung von Osmium deutlicher sichtbar wird. Nach Osmiumfixation zeigt der D-Teil elektronenoptisch eine Zusammensetzung aus entweder zwei schattendichten, formstabilen δ -Scheiben, die durch ein strahlendurchlässigeres, dehnbares γ -Stück verbunden sind, oder aus vier schattendichten δ -Lamellen und drei hellen Zwischenstücken. Das Scheibenstadium ist der Normalzustand, während das Lamellenstadium unter pathologischen Bedingungen auftritt und als Symptom der Strukturschwäche aufgefaßt wird. Durch den Krieg entwickelte sich die elektronenmikroskopische Kollagenforschung in Amerika und Europa nahezu unabhängig voneinander. Diese Trennung hat zu verschiedenen Benennungen der Periodenabschnitte geführt. Die amerikanischen Autoren benutzten zur Kontrastierung Phosphorwolframsäure (PWS) oder Chrom. Die danach auftretenden dunklen Querstreifen in der Kollagenfibrille bezeichneten sie als "bands" und die dazwischenliegenden helleren Abschnitte als "interbands". Schmitt und Gross (1948) beobachteten sechs dunkle Banden, die mit den Buchstaben a, b₁, b₂, c, d und e bezeichnet wurden. Mit der

Verbesserung der Technik zeigten schließlich Nemetschek et al. (1955) eine Unterteilung in dreizehn dunkle Querstreifen. Die ursprüngliche a-Bande und die c-Bande sind nunmehr in je vier, b und e in je zwei feine Streifen aufgelöst. Nach Hofmann et al. (1952) sind die einzelnen Banden etwa $15 \text{ \AA}$ breit. Es handelt sich wohl um die größte Auflösung, die bisher an einem biologischen Objekt gelungen ist und dürfte größenordnungsmäßig im Bereich einiger weniger Aminosäuren liegen. Der Vergleich der an zahlreichen Fibrillen verschiedener Herkunft und Vorbehandlung durchgeführten Messungen läßt eine weitgehende Übereinstimmung in der Lage der einzelnen Banden erkennen, wobei deren Intensitäten aus bis jetzt noch schwer erkennbaren Gründen oft recht wesentlich wechseln können (Nemetschek et al. 1955). Kontrastreiche und weitgehend unterteilte Querstreifungen werden im allgemeinen nach Behandlung mit Phosphorwolframsäure, Chrom (III)salz, Uranyl nitrat (Hodge und Schmitt 1960, Schwarz 1960) und Kaliumpermanganat (Nemetschek 1957) erhalten. Die dabei jeweils entstehenden charakteristischen Querstreifungsmuster lassen sich nicht vergleichen. Die Länge einer Periode, d.h. der von einer Sequenz von Querbändern besetzte Teil der Mikrofibrille, schwankt zwischen $400 \text{ \AA}$ und $1000 \text{ \AA}$, wobei die Gaußsche Verteilungskurve ein Maximum zwischen $620 \text{ \AA}$ und $660 \text{ \AA}$ zeigt. Elektronenmikroskopische Messungen von Schmitt et al. (1942) ergaben an chemisch nicht fixierten Fibrillen einen Durchschnittswert von $640 \text{ \AA}$, davon mißt die A-Bande $440 \text{ \AA}$ und die B-Bande $200 \text{ \AA}$. Beobachtet man die Querstreifung bei verschiedenen Spannungszuständen (Schmitt et al. 1942, Wolpers 1944, Mustacchi 1951), so kommt es zu entsprechender Vergrößerung der Periodenlänge um ein Vielfaches. Die kollagene Fibrille

kann aber niemals über 10% gedehnt werden, ohne zu zerreißen. Erstaunlich ist dagegen, daß die Mikrofibrille im Elektronenmikroskop mitunter bis zum Zehnfachen gedehnt gefunden wird. Das Längenverhältnis der A- zur B-Bande bleibt lange fast konstant um 2,2 : 1; allmählich dehnt sich der hellere Abschnitt stärker und zerreißt. Mittels der Kleinwinkelinterferenz konnte Bear (1942, 1944) eine sogenannte große Röntgenperiode von 640 Å entlang der normalen, trockenen Fibrillenachse bestimmen. Pratt und Wyckoff (1950) fanden im Bindegewebe neben der zweifellos am häufigsten vorkommenden großen Periode eine kleine von 210 Å, die Porter (1952) an jungen Mikrofibrillen in Gewebekulturen und Randall et al. (1952) an embryonalem Gewebe beobachteten. Wolff (1961) konnte bei embryonalen und postnatalen Kollagenfibrillen verschiedener Altersstufen aus dem Interstitium des menschlichen Herzens Periodenstufen von 70, 105 und 210 Å finden. Die Periodenlänge von 640 Å ist für die kollagenen wie auch für die meisten retikulären Strukturen (v. Herrath und Dettmer 1951) kennzeichnend, während andere Eiweiß-Fibrillen andere, jeweils charakteristische Werte aufweisen. Abgesehen von den elastischen Fasern, die keine Querstreifung besitzen, beträgt die Periodengröße einer ruhenden Myofibrille etwa $2,4\mu$ und ist damit 38 mal größer als die des Kollagens (Wolpers 1949). Hawn und Porter (1947) konnten auch beim Fibrin eine Querstreifung mit einem Wert von 180 Å beziehungsweise 250 Å messen.

Die kollagenen Mikrofibrillen können noch durch physikalische oder chemische Behandlung (Ultraschall, Säuren, Alkalien, Trypsin) in feine, fädige, parallel verlaufende Untereinheiten,

die Filamente (Durchmesser $10 \text{ m}\mu$) und in die noch feineren Protofibrillen (Durchmesser $< 5 \text{ m}\mu$) zerlegt werden. Während der Aufsplitterung der Mikrofibrillen gelingt es unter bestimmten Bedingungen gehäuft, spindelförmig gestaltete, quergestreifte Strukturen - sogenannte "tactoids" - von wechselnder Größe darzustellen (Keech 1954), die als Bildungseinheiten der Mikrofibrillen aufgefaßt werden. Mit der Darstellung der Filamente betritt der Morphologe das Bereich des Chemikers.

Bringt man Kollagen in Lösung, so liegt es in Form monomerer, makromolekularer Einheiten vor, die von Gross et al. (1954) als Tropokollagen (TC) bezeichnet wurden. Das Tropokollagenmakromolekül ist ein ziemlich starres, stabähnliches Teilchen, das als eine "asymmetrische oder strukturell polarisierte" Einheit aufgefaßt wird, d.h. die Dichteverteilung in der Längsrichtung ist so, daß das eine Ende von dem anderen klar unterscheidbar ist (Hodge und Schmitt 1960). Boedtker und Doty (1955, 1956) bestimmten mit Hilfe von physikalisch-chemischen Messungen des osmotischen Druckes, der Doppelbrechung, der Sedimentationsgeschwindigkeit und Viskosität an monodispersen Fischkollagenlösungen eine spezifische Drehung von annähernd -375° (λ) D^{20}_D , ein Molekulargewicht von rund 350 000, eine Teilchenlänge von $2900 \text{ \AA}$ und einen Durchmesser von $14 \text{ \AA}$. Die beiden letzten Dimensionen konnten durch direkte elektronenmikroskopische Bestimmungen von Hall und Doty (1958) sowie Rice (1960) bestätigt werden. Diese TC-Monomere bestehen aus mehreren, in spezifischer Weise angeordneten Polypeptidketten. In Ergänzung zu der von Pauling und Corey (1951a, b) vorgeschlagenen α -Helixstruktur der Faserproteine steht die gegenwärtig anerkannte

Strukturvorstellung des Kollagens von Ramachandran und Kartha (1954) sowie Ramachandran (1963). Demnach sind die Moleküle aus drei Peptidketten von je etwa 1000 Aminosäuren zusammengesetzt. Jede Kette bildet eine linksgewundene Schraube. Die drei Ketten sind zusätzlich um eine gemeinsame, zentrale Achse in Uhrzeigerrichtung nochmals zu einer übergeordneten Schraube verdrillt ("coiled-coil configuration of the triple helix"). In ihr beträgt der Abstand einer Aminosäure $2,85 \text{ \AA}$. Identität wird erst nach $3 \frac{1}{3}$ Umdrehungen, also 10 Aminosäuren, erreicht, wenn die nächste Kette in die Position der vorhergehenden gerückt ist. Nach 10 Umdrehungen beziehungsweise 30 Aminosäuren oder $85,8 \text{ \AA}$ ist eine volle Windung der übergeordneten Schraube vollzogen. Der mittels der Weitwinkelinterferenz gemessene Äquatorialabstand von $4,5 \text{ \AA}$ für trockenes Kollagen entspricht dem Durchmesser einer Einzelschraube, der Seitenabstand von $10,5 \text{ \AA}$ dem Durchmesser der Tripelhelix (Cowan et al. 1953). Im feuchten oder gequollenen Zustand kann sich der Abstand von $10,5 \text{ \AA}$ bis auf $16 \text{ \AA}$ und mehr vergrößern (Küntzel und Præke 1933). Rich und Crick (1961) konnten diese sogenannte Tripel-Helix-Konfiguration bestätigen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen C=O und NH Gruppen benachbarter Ketten und esterähnlichen Bindungen (Hörmann 1960) innerhalb des Moleküles stabilisiert wird. Es gibt nun drei Typen von Kollagenmonomeren, die nur im denaturierten Zustand unterscheidbar und in bestimmten Verhältnis in einer Kollagenart anwesend sind: Typ I besteht aus drei Einzelsträngen (α -Komponenten), also aus Kollagen ohne intramolekularer Vernetzung; Typ II aus einem Einzel- und zwei verbundenen Strängen (α - und β -Komponente); in Typ III sind

alle drei Peptidstränge miteinander verbunden (γ -Komponente) und bilden ein vollständig vernetztes Kollagen (Grassmann et al. 1961). Von den drei Ketten sind nach Untersuchungen von Piez et al. (1961) zwei, die mit α_1 bezeichnet werden, in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch. Die dritte, α_2 genannt, unterscheidet sich dagegen von den anderen beiden. Vorhandensein und Zahl intermolekularer Quervernetzungen sind entscheidend für den Unterschied zwischen löslichem und unlöslichen Kollagen, aber auch zwischen dem reifen jugendlichen und älteren Kollagen. Mit steigendem Alter werden die Fibrillen mehr und mehr durch Quervernetzungen verfestigt (Verzár 1956, 1964, Németh-Csóka und Kaiser 1963). Für die Gerbung ist eine Einführung zusätzlicher intermolekularer Quervernetzungen, für die Gelatine-Herstellung umgekehrt eine Auflösung der vorhandenen Quervernetzungen charakteristisch. Die besondere molekulare Struktur des zur Gruppe der Skleroproteine gehörenden Kollagenes setzt eine sich von anderen Proteinen erheblich unterscheidende Aminosäurezusammensetzung voraus. Sie ist gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Glycin, welcher etwa einem Drittel der Menge aller Aminosäuren entspricht und den Aminosäuren Prolin (14%) und Hydroxyprolin (8-9%), durch die Anwesenheit von Hydroxylysin und einen relativ geringen Gehalt an aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren (Grassmann et al. 1960). Hydroxyprolin und Hydroxylysin kommen, von geringen Ausnahmen im Tier- und Pflanzenbereich abgesehen, nur im Kollagen vor. Die Bestimmung von Hydroxyprolin ist somit eine viel verwendete Methode zur Ermittlung des Kollagengehaltes eines Gewebes und zur Verfolgung des Kollagenstoffwechsels (Stegemann 1958). Neben Aminosäuren

sind kleine Mengen von Galaktose und Glukose am Aufbau des Kollagens beteiligt (Blumenfeld et al. 1963). Spaltungsmöglichkeiten durch partielle Säure- beziehungsweise Alkali-Hydrolyse (Schroeder et al. 1954) und enzymatische Methoden wie Abbau des denaturierten Kollagens mit Trypsin oder Abbau des nativen Kollagens durch die aus *Clostridium histolyticum* gewonnene, spezifisch wirkende Kollagenase (Nagai und Noda 1959) ermöglichten eine Aminosäuresequenzermittlung. Die wichtigste sequenzanalytische Erkenntnis ergab das Vorhandensein eines Tripeptides der allgemeinen Formel $(-G-P-R)_n$, wobei G = Glycin, P = Prolin und R = jede beliebige Aminosäure wie Hydroxyprolin, Alanin, Glycin, Glutaminsäure, Arginin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Threonin und Serin, aber nicht Prolin ist. Das wichtigste Tripeptid der gesamten Kollagenstruktur hat die Sequenz Glycin- Prolin- Hydroxyprolin (u.a. Grassmann et al. 1960). Von Andreeva et al. (1961) wurden in Moskau ein Polymer des Tripeptides Glycin- Prolin- Hydroxyprolin mit einem Molekulargewicht von 25000 synthetisiert, dessen Röntgen-diagramm dem nativen Kollagen sehr ähnlich ist. Die Peptidschrauben sind so angeordnet, daß die seitenkettenfreien Glycinreste im Innern der Überschraube liegen, während die raumbeanspruchenden Pyrrolidinringe des Prolins und Hydroxyprolins sowie die langen Seitenketten der schweren und polaren Aminosäuren nach außen ragen.

Zur Erklärung der Ursache der im Elektronenmikroskop sichtbaren, hochstrukturierten Querstreifung des Kollagens wurden eine Anzahl von Theorien aufgestellt, von denen nur die von Bear (1952) erwähnt werden soll. Nach Bear

bestehen die dunklen Querstreifen aus Anhäufungen schwerer, polarer Aminosäuren, die aufgrund ihrer sperrigen Seitenketten weniger geordnete Bereiche der Periode bilden und die hellen Querstreifen vorwiegend aus leichten, apolaren Aminosäuren, die als kristallin geordnete Bereiche imponieren. Sicher ist, daß in den dunklen Teilen eine Anhäufung basischer (Arginin, Lysin) und saurer Aminosäuren (Asparagin-, Glutaminsäure) vorliegt (Kühn und Zimmer 1961a). An bestimmten Stellen der TC-Moleküle sind vorwiegend basische und an anderen Stellen vorwiegend saure Aminosäuren angeordnet. Daraus resultiert eine charakteristische Verteilung positiver und negativer Ladungen an der Oberfläche der TC-Moleküle, die ihr Verhalten wesentlich beeinflußt. Ferner ist sicher, daß die hellen Teile des elektronenmikroskopischen Bildes hauptsächlich aus Tripeptid-Sequenzen der allgemeinen Formel $(-G-P-R)_n$ aufgebaut sind. Eine wirklich scharfe Trennung liegt aber nicht vor. Die apolaren Bereiche enthalten vereinzelt auch polare Aminosäuren und umgekehrt sind beispielsweise Prolin und Hydroxyprolin auch Bestandteile polarer Sequenzen. Unentschieden ist also, welcher Grad von Ordnung in chemischem und kristallographischem Sinne diesen Bereichen zukommt. Diese Theorie wurde bald durch experimentelle Befunde über die diskontinuierliche Primärstruktur des Kollagens von Schroeder et al. (1954) sowie Grassmann et al. (1956) unterstützt. Für die Verstärkung und Ausbildung einer hochunterteilten Querstreifung mit "Kontrastmitteln", wie Phosphorwolframsäure (PWS), Chrom (III)-Komplex und Uranylazetat sind die Bereiche mit sauren und basischen Aminosäureresten verantwortlich. So wird Phosphorwolframsäure ausschließlich durch die basischen Seitenketten des

Arginins und Lysins gebunden (Kühn et al. 1957), wobei die Bindung an Arginin wesentlich stabiler ist. Der Chrom (III)-Komplex und das Uranylkation hingegen reagieren mit den Carboxylgruppen der Seitenketten der Asparagin- und Glutaminsäure (Kühn und Gebhardt 1960; Gebhardt und Kühn 1963).

Die entscheidende Wirkung der sogenannten "Anfärbemittel" liegt offenbar nicht in einer Kontrasterhöhung, sondern mehr in einem Ordnungseffekt. So reagiert zum Beispiel ein Phosphorwolfram-Ion stöchiometrisch mit drei Argininresten aus drei verschiedenen Kollagenmolekülen innerhalb der Fibrille und fixiert dadurch die basischen Aminosäuren in nebeneinanderliegenden Stellungen. Die Anhäufungen der schweren und polaren Aminosäuren verschiedener Kollagenmoleküle in den Fibrillen kommen so genauer nebeneinander zu liegen. Die Ansicht, daß den unter vorwiegender Beteiligung von Prolin und Hydroxyprolin aufgebauten apolaren Bereichen eine besondere Bedeutung für die Stabilität des Kollagenmoleküles zukommt, wird gestützt durch die charakteristische Eigenschaft der Kollagenfaser bei der Erhitzung über eine kritische Temperatur (T_g = shrinkage temperature) sich auf etwa 1/3 ihrer Länge zu verkürzen (Schmitt et al. 1942). Diese Temperatur ist für Kollagene verschiedener Herkunft verschieden und steigt nun in gesetzmäßiger Weise mit dem Gehalt an Aminosäuren, d.h. der Summe von Prolin und Hydroxyprolin (Gustavson 1956).

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß kleine Mengen von kollagenem Material in verdünnten organischen Säuren wie Essigsäure in Lösung gehen (Zachariades 1900). Nageotte (1927) fand, daß aus diesen Lösungen durch Zusatz von Natriumchlorid Kollagen in Form von Fäserchen wieder abgeschieden werden kann. Während Wyckoff und Corey (1936)

die Übereinstimmung der Weitwinkelinterferenzen zwischen nativem und ausgefälltem Kollagen bewiesen, zeigten Schmitt et al. (1942) und Bahr (1950, 1952) im Elektronenmikroskop, daß auch die rekonstruierten Kollagenfibrillen die charakteristische Querstreifung von annähernd $640 \text{ \AA}$ haben. Untersuchungen von Vanamee und Porter (1951) und Jackson und Randall (1953) führten zu gleichen Ergebnissen.

Folgende Methoden wurden zur Herstellung von Kollagenlösungen angewandt: 1.) Extraktion im sauren Bereich mit verdünnter Essigsäure - pH 4,2 (Nageotte 1927; Piez et al. 1960) oder mit Citratpuffer - pH 3,7 (Orekhovich et al. 1948).

2.) Extraktion im alkalischen Bereich mit Phosphatpuffer - pH 9 (Highberger et al. 1951). 3.) Extraktion im neutralen Bereich mit 0,14 - 1,0 m Natriumchloridlösung (Gross et al. 1955; Jackson und Fessler 1955). Durch Dialyse oder wiederholte Umfällung wurden diese Extrakte von anderen Proteinen und Mukopolysacchariden gereinigt. Ausgehend von der Erkenntnis, daß es drei Typen von Kollagenmonomeren gibt,

besteht neutralsalzlösliches Kollagen hauptsächlich aus Typ I neben etwa 10% Typ III. In sauren Extrakten wird das Molverhältnis $\alpha : \beta = 1:1$ im allgemeinen nur wenig überschritten.

Es besteht also hauptsächlich aus Typ II neben etwa 10%

Typ III. Schmitt et al. (1953, 1955) fanden, daß bei Variation des pH, der Ionenstärke sowie durch Hinzufügen unspezifischer Stoffe aus Kollagenlösungen auch Fibrillen ausfallen, die eine andere als in der Natur vorkommende Periodizität und Struktur aufweisen. Der molekulare Bau der künstlichen Kollagenformen und der Mechanismus ihrer Entstehung haben wesentlich zur

Klärung des Aufbaues der nativen Fibrille geführt. Für die verschiedenen Kollagenstrukturen läßt sich zeigen, daß ihre Entstehung durch verschiedene Anordnung des etwa 2800 Å langen TC-Moleküls zustande kommt. Folgende Querstreifungsmuster sind gegenwärtig bekannt: a) Long - spacing - Segmente (SLS). Sie wurden durch Schmitt et al. (1953) entdeckt und bilden sich aufgrund von Ladungsverschiebungen zwischen pH 2,5 - 3,5 aus sauren Kollagenlösungen durch Zugabe von ATP, sowie durch Dialyse von Neutralsalzlösungen des Kollagens gegen Essigsäure in Gegenwart von Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat (Kühn und Zimmer 1961a). Die Periodenlänge beträgt hier 2800 Å, und das aus 40-45 Querstreifen gebildete Muster ist asymmetrisch. In diesem Aggregationszustand sind die Makromoleküle Seite an Seite, parallel mit gleichen Enden und anderen Merkmalen "in Registern" angeordnet. Das asymmetrische oder polarisierte Querstreifungsmuster, das nach PWS- und Uranylazetat-Anfärbung beobachtet wird, ist ein "molekularer Fingerabdruck", da es direkt die Verteilung und Konzentrationen der basischen und sauren Aminosäuren entlang dem TC-Makromolekül widerspiegelt. Hörmann und Wilm (1964) stellten aber aus hochgereinigtem Kollagen auch Long - spacing - Segmente mit einer symmetrischen Querstreifung her. b) Long - spacing - Fibrillen (FLS). Typ I (a) wurde durch Highberger et al. (1950) und Typ II (b) durch Kühn und Zimmer (1961c) entdeckt. Sie bilden sich aus Neutralsalzlösungen des Kollagens in Gegenwart von Chondroitinsulfat (Kühn und Zimmer 1961a). Die Periodenlänge beider Fibrillenarten beträgt ca. 2500 Å, und ihre Querstreifungsmuster sind symmetrisch. Während die Kollagenmoleküle im Typ I antiparallel angeordnet sind und

sich mit ihren Enden um ungefähr 300 Å überlappen, sind die Moleküle im Typ II zusätzlich teilweise gegeneinander versetzt (Kühn und Zimmer 1961b). Der ungewöhnlich kontrastreiche Dunkelteil in der Querstreifungsperiode der Long - spacing - Fibrillen erklärt sich aus der Überlappung der Kollagenmoleküle um etwa 10%. c) Native Fibrillen. Sie stellen die einzige im adulten Wirbeltierorganismus bisher aufgefundene Strukturform des Kollagens dar (Schmitt et al. 1942; Wolpers 1943). Das Querstreifungsmuster einer Periode von etwa 640 Å ist asymmetrisch. Fibrillen des nativen Typs, die mit der nativen Fibrille in der Querstreifung völlig übereinstimmen, werden auch aus sauren Kollagenlösungen durch Dialyse gegen Wasser, etwa 1%ige Natriumchloridlösung, neutralen Phosphatpuffer oder durch Erwärmen neutraler Lösungen der Ionenstärke 0,15 - 0,4 auf 35° erhalten. Die von Schmitt (1956) vorgeschlagene Annahme, daß die Fibrillen des nativen Typs unter Versetzung der Kollagenmoleküle um jeweils 1/4 ihrer Länge gebildet werden, konnte von Hodge und Schmitt (1960) und Kühn et al. (1960) experimentell auf verschiedenen Wegen bewiesen werden. Ersteren gelang es, dimorphe Formen zwischen Long - spacing - Segmenten und Fibrillen des nativen Typs herzustellen. Dabei wachsen die Segmente an der Oberfläche der Fibrillen auf und man kann die Zuordnung des SLS - Querstreifungsmuster zu dem Muster der Fibrillen erkennen. Da sich die native Periode von 640 Å annähernd viermal auf die Länge eines "Segmentes" wiederholt, kommt jeder Streifen des nativen Musters mit vier verschiedenen Querstreifen des Segmentmusters in Berührung. Nachdem durch diese Aufnahmen die

Zuordnung bekannt war, wurde eine optische Synthese des Querstreifungsmusters des nativen Typs durchgeführt. Dazu wurden Aufnahmen von SLS - Querstreifungsmustern mehrmals übereinander kopiert, wobei nach jeder Belichtung das Segmentmuster um $1/4$ der Länge des Segmentes verschoben wurde. Die auf diese Weise entstandene Abbildung ähnelt dem Querstreifungsmuster des nativen Typs. Kühn et al. (1960) zeichnen die Photometerkurven von mit Uranylazetat behandelten Long - spacing - Segmenten um $1/4$ ihrer Länge so gegeneinander versetzt untereinander, daß sich die Schwerpunkte der positiven und negativen Ladungen möglichst gut deckten. Es ergab die graphische Addition dieser Photometerkurven eine Kurve, wie man sie von einer Fibrille des nativen Typs nach Uranylazetat-Anfärbung beobachtet. Für die End-an-End-Anlagerung der Moleküle in der Fibrille des nativen Typs haben Kühn und Zimmer (1961a) eine Überlappung von 30-40 Å angenommen. Von Kühn et al. (1964) wurden bei der Abscheidung aus durch Pepsinbehandlung hochgereinigten Kollagenlösungen auch Fibrillen mit einem symmetrischen Querstreifungsmuster und einer Periode von 640 Å beobachtet. d) Fibrillen kleiner Periodenlänge. Fibrillen mit einer 210 Å Periode, wie sie im embryonalen Gewebe vorkommen, bilden sich aus sauren Kollagenlösungen nach Zusatz einer 2%igen Natriumchloridlösung und solche mit einer 100-120 Å Periode konnten Kühn et al. (1964) wiederum aus hochgereinigten Kollagenlösungen darstellen. Von besonderem Interesse ist die Beeinflussung der Fibrillenbildung in vitro. Kinetische Studien von Wood und Keech (1960) und Wood (1964) haben ergeben, daß die Fibrillenbildung bei Erwärmen einer Neutralsalzlösung in zwei Phasen erfolgt,

einer "nucleation-phase" oder "lag-period" genannt (Bensusan und Hoyt 1958; Gross und Kirk 1958), in der die Kollagenlösung noch klar bleibt, und einer "growth-phase", in der sich durch Trübung der Lösung eine Fibrillenbildung bemerkbar macht. Beide Phasen werden durch steigende Temperatur beschleunigt und durch Erhöhung der Ionenstärke verlangsamt. In der "lag-period" kommt es zu einer Keimbildung, welche entscheidend für die darauf folgende Fibrillenwachstumsphase ist. Werden beispielsweise nach der Keimbildung die entstandenen Keime mit Hilfe einer Ultrazentrifuge entfernt, kommt es nur noch sehr zögernd zu einer Fibrillenbildung. Danach scheint nur ein Teil der Kollagenmoleküle zu einer Keimbildung befähigt zu sein. Von besonderem Einfluß ist das pH auf die Fibrillenbildung. Im isoelektrischen Bereich (pH 4,5) schlägt sich Kollagen in nur schlecht ausgebildeten Faserstrukturen sehr leicht und rasch nieder, während unter alkalischen Bedingungen (pH 6,5 - 9) die Fibrillenbildung langsamer erfolgt und sich dafür lange und gut ausgebildete Fibrillen abscheiden. Wenn auch die Zusammenlagerung der Kollagenmoleküle hauptsächlich durch das Ladungsmuster bestimmt wird, so ist es wahrscheinlich, daß das Bindegewebe über Regulatoren verfügt, die die extrazelluläre Fibrillenbildung steuern. Über den Mechanismus der Regulation ist nichts bekannt, wenn auch vermutet wird, daß die stark negativ geladenen Mukopolysaccharide die Fibrillenbildung in charakteristischer Weise beeinflussen. Wood (1960), Keech (1961) und Lowther (1963) haben den Einfluß dieser Substanzen auf die Fibrillenbildung untersucht. Danach haben Heparin und Desoxyribonukleinsäuren einen verzögernden

Effekt, dagegen wird die Fibrillenbildung durch Chondroitinsulfat A beschleunigt. Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat B haben keine Wirkung. Gross und Kirk (1958) sowie Bensusan und Hoyt (1958) haben den Einfluß von niedermolekularen Ionen, unter anderem auch von Aminosäuren untersucht und Kühn et al. (1964) haben auf die entscheidende Wirkung der nichtkollagenen Proteine des Bindegewebes auf die Fibrillenbildung hingewiesen. In dieser Arbeit soll ein weiterer Beitrag über den Mechanismus der Fibrillogenese in vitro geleistet werden. Es wird elektronenmikroskopisch an rekonstruierten Kollagenfibrillen aus der säurelöslichen Kollagenfraktion untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Rekonstruktionsdauer und dem Fibrillendurchmesser sowie der Periode besteht.

Material und Methoden

In Modifikation der Arbeitsweise von Kajikawa (1956) wurden die aus Streckersehnen der Vorder- und Hinterbeine eines sechs Wochen alten Kalbes gewonnenen, sauber isolierten Kollagenfasern in kleine Stücke zerlegt und etwa 1,5 g auf dem Gefriermikrotom bei einer Schnittdicke von 2μ zweimal geschnitten. Das Material wurde mit einem Siemens-Beschallgerät 5 Minuten lang durch hochfrequenten Schall von 10 kHz behandelt, wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen, bei hoher Umdrehungszahl (3500/min.) abzentrifugiert, in 100 ml 0,01% Essigsäure suspendiert und für einige Tage bei 4°C aufbewahrt. Die erhaltene visköse Kollagenlösung wurde durch Zentrifugieren von ungelösten Fibrillen befreit, wobei darauf zu achten ist, daß die Kollagenlösung nur bis zum Auftreten einer schwachen Opaleszenz und nicht bis zur völligen Klärung abzentrifugiert wird. Wird diese Stufe nicht erreicht, so enthält die Lösung entweder noch ungelöste Fibrillen, oder aber es lassen sich im weiteren Versuchsgang quantitativ wenig Fibrillen rekonstruieren. Im Durchschnitt genügte eine halbe Stunde Zentrifugieren bei 3500 Umdrehungen pro Minute. Um den Prozeß der Rekonstruktion von Fibrillen zu studieren, wurden zu 5 Volumenteilen Kollagenlösung 1 Volumenteil physiologische Kochsalzlösung 0,9% hinzugefügt. und in v e r s c h i e d e n e n Zeitintervallen die rekonstruierten Fibrillen rasch bei hoher Umdrehungszahl (3500/min.) abgefangen, sofort das Fällungsmittel wiederholt mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mittels einer Platinöse auf eine befilmte Blende gebracht. Die Temperatur bei der

Rekonstruktion betrug 20° C, sofern nicht anders vermerkt. Das Kontrollmaterial wurde im Versuchsgang jeweils vor Herstellung der Kollagenlösung entnommen.

Folgende Versuchsserien wurden unter Verwendung von Kollagenfasern derselben Sehne durchgeführt:

I) Native Kontrolle		Rekonstruiert	1h nativ
Rekonstruiert	15' nativ	"	24h "
"	30' "	"	24h 37°C "

II) Gleiche Anordnung wie I) mit anschließender Fixation der rekonstruierten Fibrillen in Formol 1:4.

III) Zusatz von Acetylcholin 1% beziehungsweise Suprarenin 1% zum Fällungsmittel und Fixation in Formol 1:4. Die Rekonstruktion erfolgte innerhalb von 24 Stunden bei 37° C.

Zur Kontrastierung wurden verwandt Uranylazetat 1%ig wässrige Lösung-Einwirkungsdauer 4 Minuten, Phosphorwolframsäure 2%ig wässrige Lösung-Einwirkungsdauer 3 Minuten, Osmiumsäure 2 %ig wässrige Lösung-Einwirkungsdauer 5 Minuten und eine Schrägbedampfung mit Palladium unter einem Winkel von 30° in einem Leybold-Gerät. Zur Differenzierung diente Gömöri's Silberimprägnation nach Romeis (1943). Die Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung von 5000 beziehungsweise 17000 mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop vom Typ EM 8/II bei einer Strahlspannung von 40kV beziehungsweise mit einem Siemens Elmiskop I bei einer Strahlspannung von 60-80 kV gemacht. Die Messung von je 200 Fibrillendurchmessern erfolgte auf Bildern mit einem Maßstab von 1:25000 mittels einer Meßlupe von 8 facher Vergrößerung und 1/10 mm Unterteilung. Die Meßwerte wurden graphisch dargestellt und nach Varianzanalyse verglichen, ob und mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit der jeweilige Unterschied signifikant ist. Zur Bestimmung der Periodenlängen

wurden je 100 Querstreifungsperioden ausgemessen.

Befunde

Bei Einwirkung verdünnter Essigsäure auf Kollagen wird der strukturelle Zusammenhalt immer geringer, so daß die Fibrille ihre starre zylindrische Form verliert und auseinanderfließt. Die Querstreifung geht langsam verloren, und es lassen sich zarte Filamente mit einem Durchmesser von 100-200 Å erkennen, deren Zahl mit fortschreitender Lösung immer geringer wird (Abb.: 1-4).

Wenn man die Verteilungskurven der Fibrillendicken nach verschiedener Rekonstruktionsdauer vergleicht, ergibt sich folgendes: Die nach 1/4 Stunde vermessenen, rekonstruierten nativen Fibrillen mit einer Schwankungsbreite von 20-140 m μ haben im arithmetischen Mittel einen Durchmesser von 81,5 m μ und unterscheiden sich signifikant von den ursprünglichen, unbehandelten nativen Fibrillen mit einer Schwankungsbreite von 40-180 m μ und einem mittleren Durchmesser von 114,6 m μ . Mit zunehmender Rekonstruktionsdauer (1/2 - 1 - 24 Stunden) wächst der mittlere Durchmesser (95,2 - 99,3 - 109,0 m μ), ohne aber den ursprünglichen Wert des Ausgangsmaterials zu erreichen. Zwischen den einzelnen Gruppen sind fast nur signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1% vorhanden. Eine Erhöhung der Fällungstemperatur wirkt sich hemmend auf die Fibrillendickenbildung aus. So beträgt der mittlere Durchmesser nach 24 Stunden Rekonstruktion 109,0 m μ gegenüber nur 97,4 m μ nach gleicher Zeit bei 37° C. Die Periodenlänge bleibt mit zunehmender Rekonstruktionsdauer bei Werten um 500 Å unverändert; sie liegt aber deutlich niedriger als die Kontrollmessung von 580 Å. Durch die Formalinfixation kommt es zu einer unregelmäßigen

Schrumpfung der Fibrillendurchmesser ($114,6 \rightarrow 56,9 \text{ m}\mu$) und zu einer Verminderung der Schwankungsbreite ($40 - 180 \text{ m}\mu \rightarrow 24 - 84 \text{ m}\mu$) auf je etwa die Hälfte. Signifikante Unterschiede zwischen den rekonstruierten Fibrillen werden durch die Formalinfixation aufgehoben. Die Periodizität formalinfixierter Fibrillen schwankt zwischen $484 - 564 \text{ \AA}$ erheblich. Acetylcholin und Adrenalin beeinflussen die Fibrillenbildung antagonistisch. Acetylcholin führt zu einer Zunahme und Adrenalin zu einer Abnahme des mittleren Durchmessers. Die jeweiligen Unterschiede sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,1\%$ signifikant.

Nach Gömöri-Versilberung lassen die nativen Kollagenfibrillen eine regelmäßige Innenversilberung erkennen, bei welcher das Silber in charakteristischer Weise in die D-Teile der Querstreifungsperiode eingelagert ist. Die rekonstruierte Fibrille zeigt ein wechselndes Bild. In den Partien, wo die Kristallisation zur richtigen Fibrille vor sich gegangen ist, kommt es auch zu einer Innenversilberung der Fibrille. In den Teilen, wo man noch die Filamente als Untereinheiten erkennt, liegt eine diffuse Außenversilberung längs der Filamente vor (Abb.: 23, 24).

Berechnung von Durchschnitt und Standardabweichung. Abschätzung
des Vertrauensintervalles bei Rückschlußwahrscheinlichkeit von 95%.

	<u>Durchschnitt</u>	<u>Standardabweichung</u>	<u>Vertrauensgrenze</u>	
	(m μ)	(m μ)	untere (m μ)	obere
Nativ Kontrolle	114,6	$\pm$ 28,9	110,6 >	< 118,7
Rekonst.15' nativ	81,5	$\pm$ 28,1	77,6 >	< 85,4
" 30' "	95,2	$\pm$ 22,9	92,0 >	< 98,4
" 1h "	99,3	$\pm$ 22,4	96,1 >	< 102,4
" 24h "	109,0	$\pm$ 22,6	105,9 >	< 112,2
" 24h37 ⁰ C "	97,4	$\pm$ 19,2	94,7 >	< 100,0
Formol Kontrolle	56,9	$\pm$ 12,6	55,1 >	< 58,6
Rekonst.15' Formol	51,3	$\pm$ 13,7	46,9 >	< 55,7
" 30' "	55,5	$\pm$ 13,6	50,4 >	< 60,6
" 1h "	59,8	$\pm$ 16,5	55,1 >	< 64,5
" 24h "	54,8	$\pm$ 13,6	52,9 >	< 56,7
" 24h37 ⁰ C "	57,7	$\pm$ 13,4	55,8 >	< 59,5
Formol Kontrolle	87,9	$\pm$ 14,2	85,9 >	< 89,9
Rekonst. Formol	76,7	$\pm$ 18,5	74,0 >	< 79,2
Acetylcholin rekonst. Formol	86,4	$\pm$ 17,0	84,0 >	< 88,7
Suprarenin rekonst. Formol	61,7	$\pm$ 15,5	59,2 >	< 64,2

Vergleich von mehr als zwei Durchschnitten

I) Einfache Varianzanalyse, F-Test

Gruppe 1) Nativ Kontrolle

- " 2) Rekonstruiert 15' nativ
- " 3) " 30' "
- " 4) " 1h "
- " 5) " 24h "

Schlußurteil (Varianzanalyse): Die rekonstruierten Fibrillen wurden einer Varianzanalyse unterworfen. Dabei ergab der F-Test, daß Varianzinhomogenität in allen Gruppen besteht ($P < 0,01$).

Die Null-Hypothese ist mit einer I.W. von $P < 0,01$ zu verwerfen.

t-Test nach Varianzanalyse (wenn alle n_i gleich groß)

<u>Vergleich der Gruppen</u>	<u>Urteil mit Angabe der I.W.</u>
1) mit 2)	signifikant 0,1%
1) mit 3)	signifikant 0,1%
1) mit 4)	signifikant 0,1%
1) mit 5)	signifikant 5%
2) mit 3)	signifikant 0,1%
3) mit 4)	nicht signifikant
4) mit 5)	signifikant 0,1%

II) Varianzanalyse, F-Test

Gruppe 1) Formol Kontrolle

- " 2) Rekonstruiert 15' Formol
- " 3) " 30' "
- " 4) " 1h "
- " 5) " 24h "

Schlußurteil (Varianzanalyse): Der F-Test ergab, daß Varianzinhomogenität in allen Gruppen besteht ($P = 0,05$). Die Null-Hypothese ist mit einer I.W. von $P = 0,05$ zu verwerfen.

t-Test nach Varianzanalyse (Vergleich einzelner Durchschnitte)

Vergleich der Gruppen	Urteil mit Angabe der I.W.
1) mit 2)	signifikant 5%
1) mit 3)	nicht signifikant
1) mit 4)	nicht signifikant
1) mit 5)	nicht signifikant
2) mit 3)	nicht signifikant
3) mit 4)	nicht signifikant
4) mit 5)	signifikant 5%

III) Einfache Varianzanalyse, F-Test

Gruppe 1) Formol Kontrolle

" 2) Rekonstruiert Formol

" 3) Acetylcholin rekonstruiert Formol

" 4) Suprarenin rekonstruiert Formol

Schlußurteil (Varianzanalyse): Der F-Test ergab, daß Varianzinhomogenität in allen Gruppen besteht ($P < 0,01$). Die Null-Hypothese ist mit einer I.W. von $P < 0,01$ zu verwerfen.

t-Test nach Varianzanalyse (Vergleich einzelner Durchschnitte)

Vergleich der Gruppen	Urteil mit Angabe der I.W.
1) mit 2)	signifikant 0,1%
1) mit 3)	nicht signifikant
1) mit 4)	signifikant 0,1%
2) mit 3)	signifikant 0,1%
3) mit 4)	signifikant 0,1%

Periodenlänge (Ausmessung von je 100 Querstreifungsperioden)

Nativ Kontrolle	580 Å	Formol Kontrolle	564 Å
Rekonst.15' nativ	506 Å	Rekonst.15' Formol	564 Å
" 30' "	500 Å	" 30' "	564 Å
" 1h "	494 Å	" 1h "	600 Å
" 24h "	500 Å	" 24h "	492 Å
" 24h37°C "	512 Å	" 24h37°C "	484 Å

Formol Kontrolle	538 Å
Rekonstruiert Formol	534 Å
Acetylcholin rekonstruiert Formol	516 Å
Suprarenin rekonstruiert Formol	464 Å

Diskussion

Die Beobachtung einer Ausfällung von Fibrillen aus Kollagenlösungen in v i t r o ist von Interesse, weil sie Einblicke in die Struktur der Kollagenfibrille und in den Mechanismus der Fibrillogenese in vivo vermittelt. Dabei tauchen zwei Probleme auf. Das erste Problem ist, wie werden die Fibrillen aus der Kollagenlösung gebildet und das zweite, welche Faktoren haben einen Einfluß auf diesen Prozeß? Durch die Arbeiten von Nageotte (1927), Schmitt et al. (1942), Vanamee und Porter (1951), Bahr (1952), Jackson und Randall (1953) sowie Kajikawa (1956) wurde gezeigt, daß unter bestimmten Bedingungen nach Zugabe von Natriumchlorid zu einer Kollagenlösung Fibrillen rekonstruiert werden, welche die charakteristische, periodische Querstreifung nativen Kollagens haben. Die Aggregation von Tropokollagen zu nativem Kollagen ist hauptsächlich abhängig von dem pH, der Ionenstärke, der Wertigkeit der beteiligten Ionen, der Temperatur und der Reinheit der Tropokollagenlösung. Bei einem pH um 3,5 und einer Temperatur von 0°C entstehen normale (native) Fibrillen bei einer NaCl-Konzentration von 0,02-0,2 m. Fibrillen mit einer 210 Å Periode, die für embryonales Gewebe kennzeichnend sind (Randall et al. 1952), bilden sich in 0,35 m NaCl, während Fibrillen ohne eine Periodizität also ohne Querstreifung durch die Einwirkung einer 0,5 m Kochsalzlösung ausfallen. Unsere Präzipitationsversuche erfolgten bei einem pH von 3,8 und mit einer 0,17 m NaCl-Lösung. Gross et al. (1955) hingegen benutzten eine 0,2 m Natriumchloridlösung, um Kollagen bei pH 7,0 sowie 0°C zu lösen und erreichten eine Rekonstruktion von

nativen Fibrillen entweder durch Verminderung der Ionenstärke mittels Dialyse gegen destilliertes Wasser oder durch Erwärmung der Lösung auf 37° C. Sie konnten damit zeigen, daß die Aggregation von Tropokollagen zu nativem Kollagen bei pH 7,0 eine Eigenschaft des isolierten Moleküles selbst ist und die Bildung von Fibrillen auch in Abwesenheit anderer Makromoleküle (z.B. der Mukopolysaccharide des Bindegewebes) oder Salze zumindest *in vitro* erfolgt. Daß sich Fibrillen vom nativen Typ nur innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches und bei gewisser Ionenstärke bilden können, wurde schon früh von Bahr (1950) sowie Vanamee und Porter (1951) entdeckt, die systematische elektronenmikroskopische Untersuchungen an präzipitierten Rattenschwanzsehnen aus der säurelöslichen Fraktion durchführten und klar die Abhängigkeit der Fibrillendicke und der Menge der gebildeten Fibrillen von diesen Faktoren erkannten. Kajikawa (1956), Gross und Kirk (1958), Bensusan und Hoyt (1958), besonders Wood und Keech (1960) und Wood (1960, 1964) haben versucht, ihre kinetischen Studien über die Fibrillenbildung mit der Fibrillendicke zu verknüpfen. So fanden sie, daß bei Zunahme der Präzipitation durch Temperaturerhöhung oder Verminderung der Ionenstärke die Fibrillendicke sich verringert und andererseits bei Zunahme der Präzipitation durch pH-Abfall die Fibrillendicke wächst. Die genannten Autoren haben einer systematischen elektronenmikroskopischen Untersuchung der Fibrillendicke besonders in Abhängigkeit von der Präzipitationsdauer nur geringe Aufmerksamkeit gewidmet. In der Hauptsache konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, daß eine Beziehung zwischen Fibrillendicke und Rekonstruktionszeit

besteht. Nach unseren Befunden entstehen bei der Rekonstruktion nach kurzer Zeit dünne Fibrillen mit einem mittleren Durchmesser von $81,5 \text{ m}\mu$ und einer Schwankungsbreite der Verteilungskurve von $20 - 140 \text{ m}\mu$. Mit zunehmender Rekonstruktionsdauer wächst der mittlere Durchmesser auf $109,0 \text{ m}\mu$ und die Schwankungsbreite verschiebt sich nach $56 - 180 \text{ m}\mu$. Dabei wird aber der ursprüngliche Wert des Ausgangsmaterials von $114,6 \text{ m}\mu$ mit einer Schwankungsbreite von $40 - 180 \text{ m}\mu$ nicht erreicht. Während dieser statistisch gesicherten Dickenzunahme verändert sich die Periodenlänge von rund $500 \text{ \AA}$ nicht, aber sie ist auch deutlich kleiner als der ursprüngliche Wert des Ausgangsmaterials von $580 \text{ \AA}$. Bemerkenswert ist, daß nach der Rekonstruktion die Fibrillen dünner und die Periodenlängen kürzer sind. So beträgt der Durchmesser der kleinsten Fibrillen vor der Rekonstruktion $40 \text{ m}\mu$ und nach der Rekonstruktion $20 \text{ m}\mu$; der mittlere Durchmesser vorher $114,6 \text{ m}\mu$ und nachher $109,0 \text{ m}\mu$. Unter den gegebenen Bedingungen ist es also nicht möglich, die ursprünglichen Dimensionen der Fibrille zu rekonstruieren. Die ermittelten Fibrillendurchmesser stehen in Übereinstimmung mit Messungen von Wassermann (1951) und Harkness (1961), ebenso liegen unsere Werte für die Periodenlänge innerhalb der normalen Schwankungsbreite, die die bekannte $640 \text{ \AA}$ Periodik (Schmitt et al. 1942 und Bear 1942, 1944) zeigt. Daß sich eine Erhöhung der Fällungstemperatur hemmend auf die Fibrillendickenbildung auswirkt, fanden wir in einer Beobachtung von Wood und Keech (1960) bestätigt. Für die von Kajikawa (1956, 1961) aus ähnlichen Versuchen abgeleitete Vorstellung, daß mit dem Wachstum des Fibrillendurchmessers auch die Periodenlänge wächst und die Fibrillen mit einer unter $640 \text{ \AA}$

messenden Periodik sich in einem frühen Stadium der Entwicklung befinden, wie die 210 Å Periode zeigt, die Porter (1952) an jungen Mikrofibrillen in Gewebskulturen und Randall et al. (1952) in embryonalem Gewebe beobachteten, konnten wir keinen Beweis liefern. Durch die Formalinfixation kommt es zu einer Schrumpfung der Fibrillendurchmesser und zu einer Verminderung der Schwankungsbreite der Verteilungskurven auf je etwa die Hälfte. Diese erheblichen Veränderungen sind, abgesehen von möglichen Meßfehlern, einmal durch Trocknung an der Luft und Verdampfung des chemisch nicht gebundenen Wassers im Hochvakuum des Elektronenmikroskopes zu erklären und zum anderen hauptsächlich bedingt durch die Einführung von künstlichen Quervernetzungen durch Formaldehyd. Durch die steigende Zahl von Brücken zwischen den Molekülen wird die Quellung und damit der Gehalt an Lösungsmittel in der Fibrille verringert. Wolpers (1944, 1948) hat durch Anwendung und Umgehung verschiedenster präparativer Verfahren den Einfluß auf die Feinstruktur der kollagenen Bindegewebsfibrillen festzustellen versucht und ist zu ähnlichen Ergebnissen gelangt. Interessant ist die Feststellung, daß Acetylcholin zu einer Zunahme und Adrenalin zu einer Abnahme der mittleren Fibrillendicke führt. Der antagonistische Einfluß dieser Substanzen auf die Zusammenlagerung der Kollagenmoleküle läßt vermuten, daß dieser durch die unterschiedlichen Ladungsverhältnisse zwischen quartären Ammoniumbasen und Aminen hervorgerufen wird. Die Versilberungsmethode von Gömöri (1937) gestattet nach unseren Befunden die Unterscheidung zwischen nativen und rekonstruierten kollagenen Sehnenfibrillen. Während die nativen Fibrillen eine regelmäßige Innenversilberung zeigen, lassen

die rekonstruierten Fibrillen abwechselnd eine Innenversilberung und eine unregelmäßige Außenversilberung erkennen. Verglichen mit der von Schwarz (1955) angegebenen elektronenoptischen Unterscheidung von Differenzierungsprozessen an Bindegewebsfibrillen entspricht der Versilberungsmodus einer nativen Sehnenfibrille dem einer typisch reifen Kollagenfibrille und die Art der Versilberung nach Rekonstruktion der für Fibrillen embryonalen Bindegewebes. Untersuchungen von Schwarz (1955b), Schwarz und Merker (1959) sowie Kajikawa (1961) lassen den Schluß zu, daß der Versilberungsmodus von der Menge und von der Lokalisation der Kohlenhydratkomponente beeinflußt wird. In unseren Rekonstruktionsversuchen konnte die durchschnittliche Dicke der Fibrillen des Ausgangsmaterials auch nach 24 Stunden nicht erreicht werden. Von den Kollagenfibrillen des Gewebes ist aber bekannt, daß sie in Abhängigkeit vom Alter und der Funktion ihre Dicke verändern können (Schwarz 1953, 1957). Dieses unterschiedliche Verhalten bei der *in vitro* - und *in vivo* - Entstehung der Fibrillen spricht dafür, daß *in vivo* noch andere Einflüsse wirksam werden, die im Reagenzglasversuch noch nicht kopiert werden können. Eine solche Beeinflussung könnte zum Beispiel durch Steroidhormone bewirkt werden. So konnte nachgewiesen werden, daß unter Cortisoneinfluß eine schnellere Ausreifung und damit Verdickung der Fibrillen vor sich geht (Fick et al. 1960), beziehungsweise nach Adrenalectomie eine Verringerung der Fibrillendicken eintritt (Carsten et al. 1961).

Zusammenfassung

Anhand der vorliegenden Literatur wurden die Ergebnisse der Kollagenforschung unter besonderer Berücksichtigung der Morphologie der Kollagenfibrille zusammengestellt.

Die eigenen Versuche beziehen sich auf die elektronenmikroskopische Untersuchung der nach Aussalzung durch Natriumchlorid aus der säurelöslichen Kollagenfraktion rekonstruierten Kollagenfibrillen vom Kalb. Dabei sollten folgende Fragestellungen beachtet werden:

1. Besteht eine Beziehung zwischen Rekonstruktionsdauer und der Fibrillendicke sowie der Fibrillenperiode?
2. Welche Veränderungen treten nach Formalinfixation auf?
3. Haben Acetylcholin und Adrenalin einen Einfluß auf die Fibrillenbildung?
4. Unterscheiden sich native und rekonstruierte Kollagenfibrillen?

Nach unseren Befunden entstehen bei der Rekonstruktion nach kurzer Zeit dünne Fibrillen, deren Durchmesser in Abhängigkeit von der Zeit langsam wächst, ohne aber die Fibrillendicke des Ausgangsmaterials zu erreichen. Diese Dickenzunahme mit zunehmender Rekonstruktionsdauer wurde statistisch gesichert. Während des Wachstumsprozesses verändert sich die Periodenlänge nicht. Durch die Formalinfixation kommt es zu einer unregelmäßigen Schrumpfung der Fibrillendurchmesser und zu einer Verminderung der Schwankungsbreite der Verteilungskurven auf je etwa die Hälfte. Acetylcholin führt

zu einer Zunahme und Adrenalin zu einer Abnahme der Fibrillendicke. Die jeweiligen Unterschiede sind signifikant.

Nach Gömüri-Versilberung lassen die nativen Kollagenfibrillen eine regelmäßige Innenversilberung erkennen, im Gegensatz zur rekonstruierten Fibrille, die abwechselnd eine Innenversilberung und eine unregelmäßige Außenversilberung zeigt.

Literaturverzeichnis:

- Andreeva, N.S., V.A. Debabov, M.N. Millionova, V.A. Shibnev
and Yu.N. Chirgadze: Synthetic polymer iso-
morphous to collagen. Biofizika 6, p. 244 (1961).
Übersetzung: Biophysics 6 , p. 272 (1961).
Pergamon Press 1962.
- Bahr, G.: The reconstitution of collagen fibrils as
revealed by electron microscopy. Exp. Cell
Res. 1, p. 603-606 (1950).
- Bahr, G.: Über einige Eigenschaften rekonstituierter
kollagener Fasern. Exp. Cell Res. 3, S. 485-488
(1952).
- Banga, I.J. Baló and D. Szabó: Contraction and relaxation of
collagen fibres. Nature (London) 174, p.788-
789 (1954).
- Bargmann, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des
Menschen. 5, S. 100-104 (1964).
- Bear, R.S.: Long X-ray diffraction spacings of collagen.
J.Amer. Chem. Soc. 64, p. 727 (1942).
- Bear, R.S.: X-ray diffraction studies on protein fibers. I.
The large fiber axis period of collagen. J.Amer.
Chem. Soc. 66, p. 1297-1305 (1944).
- Bear, R.S.: The structure of collagen fibrils. Adv. Protein
Chem. 7, p. 69-160 (1952).
- Bensusan, H.B. and B.L. Hoyt: The effect of various parameters
on the rate of formation of fibers from collagen
solutions. J. Amer. Chem. Soc. 80, p. 719-724
(1958).

- Blumenfeld, O.O., M.A. Paz, P.M. Gallop and S. Seifter: The nature, quantity and mode of attachment of hexoses in ichthyocol. J. Biol. Chem. 238, p. 3835-3839 (1963).
- Boedtker, H. and P. Doty: On the nature of the structural element of collagen. J. Amer. Chem. Soc. 77, p. 248-249 (1955).
- Boedtker, H. and P. Doty: The native and denatured states of soluble collagen. J. Amer. Chem. Soc. 78, p. 4267-4280 (1956).
- Bucher, O.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 3, S. 140-147 (1962).
- Carsten, P.-M., H.J. Merker und Th. Günther: Über den Einfluß von Nebennierenrinden-Hormonen auf Fibrillen und Kittsubstanz der Haut. Z. Naturforsch. 16b, S. 679-683 (1961).
- Cowan, P.M., A.C.T. North and J.T. Randall: High-angle X-ray diffraction of collagen fibres. In: Nature and structure of collagen. J.T. Randall (Edit.), London Butterworths scientific publications, p. 241-249 (1953).
- Fick, K., R. Fricke, G. Gattow, F. Hartmann und W. Schwarz: Untersuchungen über die Struktur und Funktion des Bindegewebes. Z. Rheumaforsch. 19, S. 293-310 (1960).
- Gebhardt, E. und K. Kühn: Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Uranylacetat mit Kollagen. Z. anorg. allg. Chemie 320, S. 71-77 (1963).

- Gömöri, G.: Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. Amer. J. Path. 13, p. 993-1002 (1937).
- Grassmann, W., K. Hannig, H. Endres und A. Riedel: Zur Bindungsweise des Prolins und Hydroxyprolins. Aminosäuresequenzen des Kollagens. I. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 306, S. 123-131 (1956).
- Grassmann, W., K. Hannig und M. Schleyer: zur Aminosäuresequenz des Kollagens, II. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 322, S. 71-95 (1960).
- Grassmann, W., K. Hannig und J. Engel: Das quantitative Verhältnis zwischen α - und β -Komponente des denaturierten, löslichen Kollagens in der Ultrazentrifuge sowie Beschreibung einer schneller sedimentierenden γ -Komponente. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 324, S. 284-288 (1961).
- Grassmann, W., J. Engel, K. Hannig, H. Hörmann, K. Kühn und A. Nordwig: Kollagen. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Herausgeber L. Zechmeister, Springer Verlag 23, S. 195-314 (1965).
- Gross, J., J.H. Highberger and F.O. Schmitt: Collagen structures considered as states of aggregation of kinetic units. The tropocollagen particle. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 40, p. 679-688 (1954).

- Gross, J., J.H. Highberger and F.O. Schmitt: Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 41, p. 1-11 (1955).
- Gross, J. and D. Kirk: The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions: Some rate-regulating factors. *J. Biol. Chem.* 233, p. 355-360 (1958).
- Gustavson, K.H.: The Chemistry and Reactivity of Collagen. New York: Academic Press. 1956.
- Hall, C.E. and P. Doty: A comparison between the dimensions of some macromolecules determined by electron microscopy and by physical chemical methods. *J. Amer. Chem. Soc.* 80, p. 1269-1274 (1958).
- Harkness, R.D.: Biological functions of collagen. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 36, p. 399-463 (1961).
- Hawn, C.V.Z. and K.R. Porter: The fine structure of clots formed from purified bovine fibrinogen and thrombin: a study with the electron microscope. *J. Exp. Med.* 86, p. 285-292 (1947).
- Herrath, E.v. und N. Dettmer: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gitterfasern. *Z. wiss. Mikrosk.* 60, S. 282-289 (1951).
- Hertwig, O.: Das Werden der Organismen 1, (1916). Jena, G. Fischer.
- Highberger, J.H., J. Gross and F.O. Schmitt: Electron microscope observations of certain fibrous structures obtained from connective tissue extracts. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, p. 3321-3322 (1950).

- Highberger, J.H., J. Gross and F.O. Schmitt: The interaction of mucoprotein with soluble collagen; an electron microscope study. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37, p. 286-291 (1951).
- Hodge, A.J. and F.O. Schmitt: The charge profile of the tropo-collagen macromolecule and the packing arrangement in native-type collagen fibrils. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 46, p. 186-197 (1960).
Übersetzung von K.Kühn: Leder 11, S.74-85 (1960).
- Hofmann, U., Th. Nemetschek und W. Grassmann: Über die Querstreifung von Kollagenfibrillen und ihre Veränderung im Elektronenmikroskop. Z.Naturforsch. 7 b, S. 509-513 (1952).
- Hörmann, H.: Struktur und Wachstum des Kollagens. Beiträge zur Silikoseforschung. Band 4, S. 205-229 (1960).
- Hörmann, H. und M.v. Wilm: Kollagensegmente mit symmetrischer Querstreifung. Naturwiss. 51, S. 464-465 (1964).
- Jackson, D.S. and J. Fessler: Isolation and properties of a collagen soluble in salt solution at neutral pH. Nature (London) 176, p. 69-72 (1955).
- Jackson, S.F. and J.T. Randall: The reconstruction of collagen fibrils from solution. In: Nature and structure of collagen. J.T. Randall (Edit.), London, p. 181-191 (1953).
- Kajikawa, K.: Electron microscopic observations on reconstituted fibrils from dissolved collagen. Acta Path. Jap. Vol. 6, No. 1, p. 37-49 (1956).

- Kajikawa, K.: Structure of collagen fibrils as revealed by electron microscopy. J. Electron-microscopy Vol. 10, No. 1, p. 1-6 (1961).
- Keech, M.K.: The effect of collagenase and trypsin on collagen. An electron microscope study. Anat. Rec. 119, p. 139-159 (1954).
- Keech, M.K.: The formation of fibrils from collagen solutions. IV. Effect of mucopolysaccharides and nucleic acids: An electron microscope study. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 9, p. 193-209 (1961).
- Kühn, K., W. Grassmann und U. Hofmann: Über die Bindung der Phosphorwolframsäure im Kollagen. Naturwiss. 44, S. 538-539 (1957).
- Kühn, K., W. Grassmann und U. Hofmann: Über den Aufbau der Kollagenfibrille aus Tropokollagenmolekeln. Naturwiss. 47, S. 258-259 (1960).
- Kühn, K. und E. Gebhardt: Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Chrom(III)-komplexen mit Kollagen. Z. Naturforsch. 15 b, S. 23-30 (1960).
- Kühn, K. und E. Zimmer: Eigenschaften des Tropokollagen-Moleküls und deren Bedeutung für die Fibrillenbildung. Z. Naturforsch. 16 b, S. 648-658 (1961 a).
- Kühn, K. und E. Zimmer: Über die Anordnung der Tropokollagenmolekeln in den Long-spacing-Kollagenfibrillen. Naturwiss. 48, S. 219-220 (1961 b).

- Kühn, K. und E. Zimmer: Über eine neue Form der Long-spacing-Fibrillen des Kollagens. *Naturwiss.* 48, S. 220 (1961 c).
- Kühn, K., G. Schuppler und J. Kühn: Veränderungen im Verhalten des Kollagens mit zunehmender Reinigung und nach Behandlung mit proteolytischen Enzymen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 338, S. 10-31 (1964).
- Küntzel, A. und F. Pranke: Morphologie und Feinbau der kollagenen Faser. *Biochem. Z.* 267, S. 243-295 (1933).
- Linke, K.W.: Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Differenzierung der Interzellulärsubstanz der menschlichen Lederhaut. *Z. Zellforsch.* 42, S. 331-343 (1955).
- Lowther, D.A.: Chemical aspects of collagen fibrillogenesis. *International review of connective tissue research* 1, p. 63-125 (1963).
- Maximow, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In: W. v. Möllendorff's Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen II/1, S. 232-583 (1927).
- Mustacchi, P.O.: Extensibility and minimum number of polypeptide chains in the collagen micelle. *Science (Lancaster, Pa.)* 113, p. 405-407 (1951).
- Nagai, Y. and H. Noda: The specificity of collagenase. *Biochim. Biophys. Acta* 34, p. 298-299 (1959).

- Nageotte, J.: Caillot et gelée de collagène. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 97, p. 559-561 (1927).
- Németh-Csóka M., M. Kaiser: The effect of aging-induced changes of collagen protein on fibrillogenesis in vitro. *Acta morph. tomus XIII*, S. 119-129 (1963). Hungary.
- Nemetschek, Th., W. Grassmann und U. Hofmann: Über die hoch-
unterteilte Querstreifung des Kollagens.
Z. Naturforsch. 10 b, S. 61-68 (1955).
- Nemetschek, Th.: Die unterteilte Querstreifung von Kollagen nach Behandlung mit Kaliumpermanganat.
Naturwiss. 44, S. 623-624 (1957).
- Orekhovich, V.N., A.A. Tustanovski, K.D. Orekhovich and N.E. Plotnikova: Procollagen of hide.
Biokhimiya (U.S.S.R.) 13, p. 55-60 (1948).
- Pauling, L. and R.B. Corey: Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37, p. 235-240 (1951 a).
- Pauling, L. and R.B. Corey: The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37, p. 272-281 (1951 b).
- Piez, K.A., E. Weiss and M.S. Lewis: The separation and characterization of the α - and β -components of calf skin collagen. *J. Biol. Chem.* 235, p. 1987-1991 (1960).
- Piez, K.A., M.S. Lewis, G.R. Martin and J. Gross: Subunits of the collagen molecule. *Biochim. Biophys. Acta* 53, p. 596-598 (1961).

- Porter, K.R.: Repair processes in connective tissues. In: Connective tissues. Transactions of the second conference May 24-25, 1951, New York, N.Y. Josiah Macy, Jr. Foundation, p. 126-158 (1952).
- Pratt, A.W. and R.W.G. Wyckoff: The fine structure of connective tissue fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* 5, p. 166-174 (1950).
- Ramachandran, G.N. and G. Kartha: Structure of collagen. *Nature* 174, p. 269-270 (1954).
- Ramachandran, G.N.: Molecular structure of collagen. International review of connective tissue research 1, p. 127-182 (1963).
- Randall, J.T., R.D.B. Fraser, S. Jackson, A.V.W. Martin and A.C.T. North: Aspects of collagen structure. *Nature (London)* 169, p. 1029-1033 (1952).
- Rice, R.V.: Reappearance of certain structural features of native collagen after thermal transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46, p. 1186-1194 (1960).
- Rich, A. and F.H.C. Crick: The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* 3, p. 483-506 (1961).
- Romeis, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik: Bielschowsky-Methode zur Darstellung des Bindegewebes modifiziert von Gömöri 14, S. 514-516, Verlag von R. Oldenbourg (1943).
- siehe : Gömöri, G.: Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *Amer. J. Path.* 13, p. 993-1002 (1937).

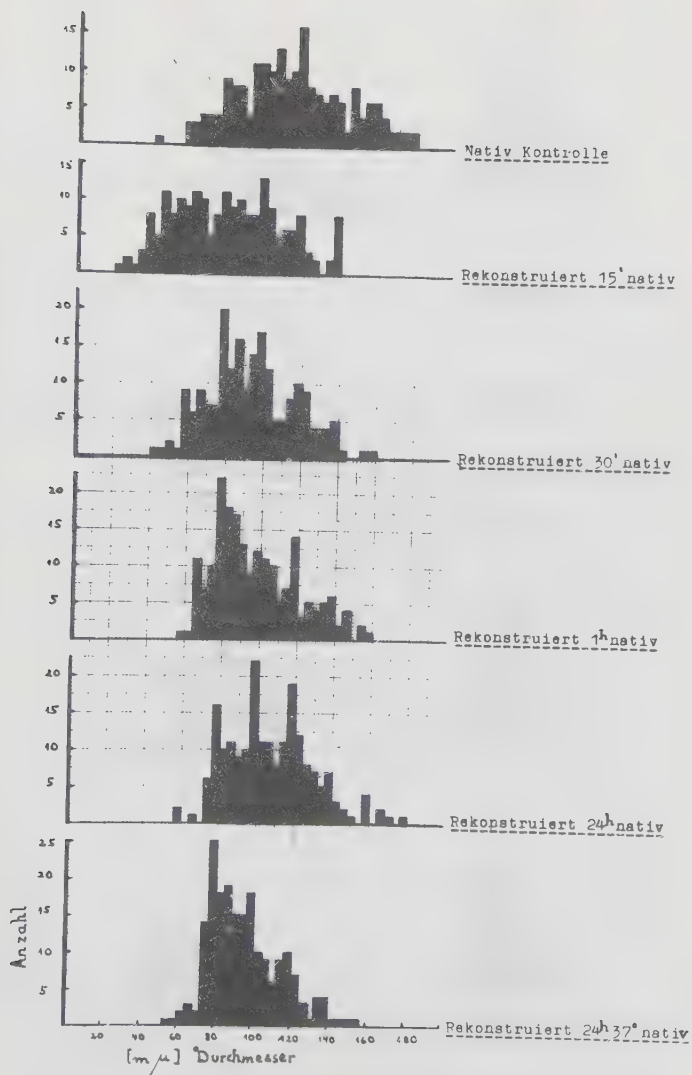
- Schmitt, F.O., C.E. Hall and M.A. Jakus: Electron microscope investigations of the structure of collagen. J. Cellul. Comp. Physiol. 20, p. 11-33 (1942).
- Schmitt, F.O., C.E. Hall and M.A. Jakus: Fine structure in the fiber-axis macroperiod of collagen fibrils. J. Appl. Phys. 16, p. 263-264 (1945).
- Schmitt, F.O. and J. Gross: Further progress in the electron-microscopy of collagen. J. Amer. Leather Chemists' Assoc. 43, p. 658-675 (1948).
- Schmitt, F.O., J. Gross and J.H. Highberger: A new particle type in certain connective tissue extracts. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 39, p. 459-465 (1953).
- Schmitt, F.O., J. Gross and J.H. Highberger: States of aggregation of collagen. Sympos. Soc. Exp. Biol. 9, p. 148-162 (1955).
- Schmitt, F.O.: Macromolecular interaction patterns in biological systems. Proc. Amer. Philos. Soc. 100, p. 476-486 (1956).
- Schroeder, W.A., L.M. Kay, J. Le Gette, L. Honnen and F.C. Green: The constitution of gelatin. Separation and estimation of peptides in partial hydrolysates. J. Amer. Chem. Soc. 76, p. 3556-3564 (1954).
- Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Cornea und Sklera des Menschen. Verhandlungen der Anat. Ges. in Marburg 99, S. 263-265 (1952).

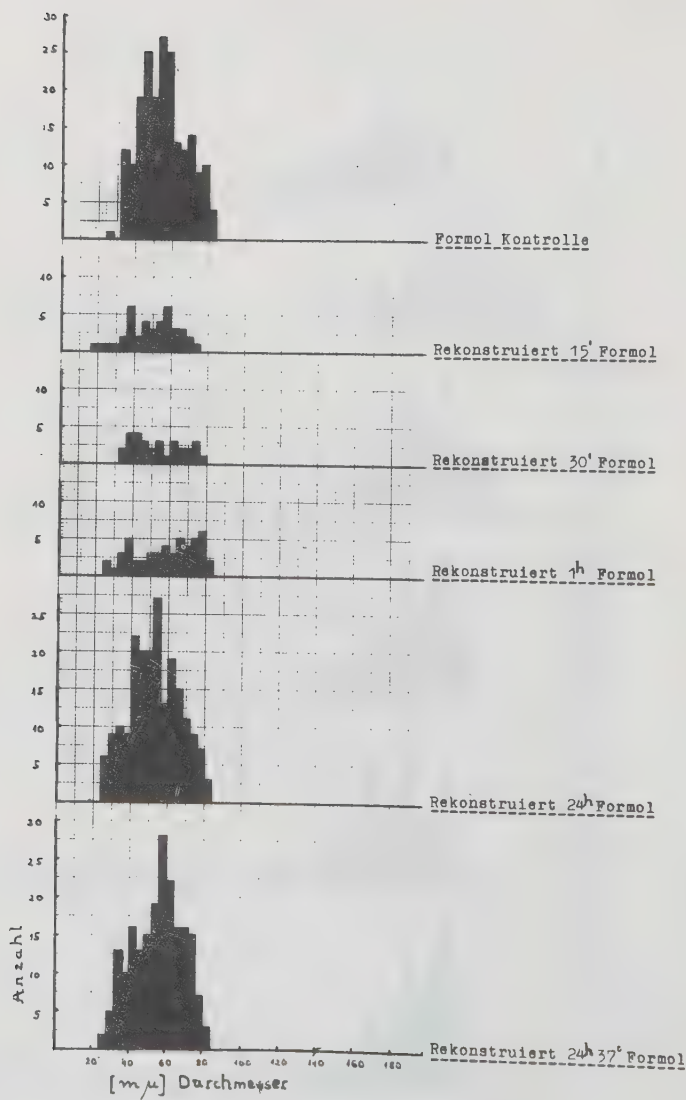
- Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Sklera und der Cornea des Menschen. Z. Zellforsch. 38, S. 26-49 (1953).
- Schwarz, W.: Die Zwischensubstanzen des Bindegewebes. In: Kapillaren und Interstitium. Herausgeber Bartelheimer und Kückmeister, S. 29-40 (1955a).
- Schwarz, W.: über die Morphologie der verschiedenen Bindegewebsfasern unter besonderer Berücksichtigung des Kollagens. In: Beiträge zur Silikoseforschung; Sonderband: Grundfragen aus der Silikoseforschung 1, S. 173-183 (1955b).
- Schwarz, W.: Morphology and differentiation of the connective tissue fibres. In: Connective tissue, a symposium by CIOMS, edit. by Tunbridge, p. 144-156, Oxford: Blackwell Sci. Publ. (1957).
- Schwarz, W. und H.-J. Merker: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Innenversilberung der Sehnenfibrillen. Z. Zellforsch., Abt. Histochem. 1, S. 225-240 (1959).
- Schwarz, W.: Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes. In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, II. Symposium Oktober 1959, Herausgeber Hauss und Losse, S. 106-178 (1960).
- Stegemann, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 311, S. 41-45 (1958).

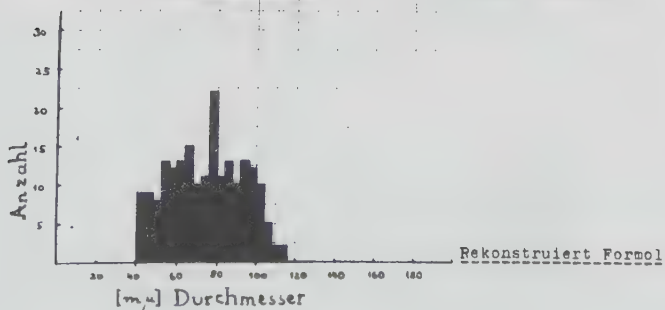
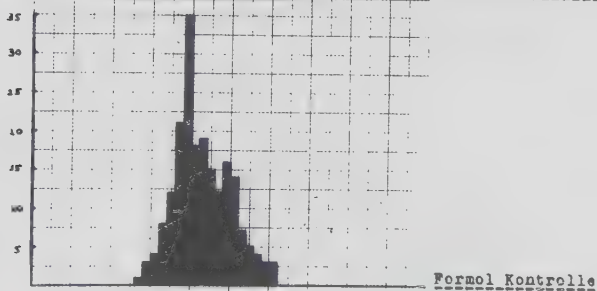
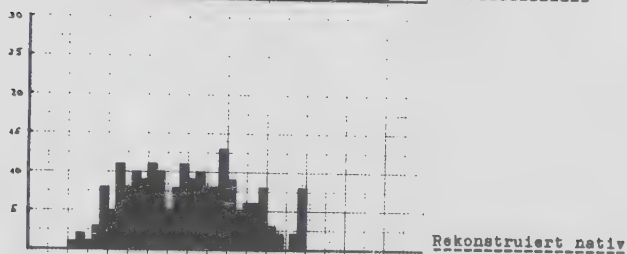
- Vanamee, P. and K.R. Porter: Observations with the electron microscope on the solvation and reconstitution of collagen. J. exp. Med. 94, p. 255-268 (1951).
- Verzár, F.: Veränderungen der thermoelastischen Eigenschaften von Sehnenfasern beim Altern. Experientia 11, S. 230 (1955).
- Verzár, F.: Das Altern des Kollagens. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 14, S. 207-220 (1956).
- Verzár, F.: Aging of the collagen fiber. International review of connective tissue research 2, p. 243-300 (1964).
- Wassermann, F.: Electron microscope study of the submicroscopic network of fibrils as a component of connective tissue. Anat. Rec. 111, p. 145-170 (1951).
- Wassermann, F.: The intercellular components of connective tissue: origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte 35, S. 240-333 (1956). Springer-Verlag.
- Wolff, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Altersveränderungen am interstitiellen Bindegewebe des menschlichen Herzens. Z. Rheumaforsch. 20, S. 175-192 (1961).
- Wolpers, C.: Kollagenquerstreifung und Grundsubstanz. Klin. Wochenschr. 22, S. 624 (1943).

- Wolpers, C.: Die Querstreifung der kollagenen Bindege-
websfibrille. Virchows Archiv 312, S. 292-
302 (1944).
- Wolpers, C.: Das Scheiben- und das Lamellenstadium der
Kollagenquerstreifung. Molekulare Chemie 2,
S. 37-47 (1948).
- Wolpers, C.: Elektronenmikroskopie der Plasma-Derivate.
In: Grenzgebiete der Medizin 2, S.527 -
535 (1949).
- Wood, G.C. and M.K. Keech: The formation of fibrils from
collagen solutions. 1. The effect of experi-
mental conditions: Kinetic and electron-
microscope studies. Biochem. J. 75, p. 588-
598 (1960).
- Wood, G.C.: The formation of fibrils from collagen
solutions. 3. Effect of chondroitin sulphate
and some other naturally occurring polyanions
on the rate of formation. Biochem. J. 75,
p. 605-612 (1960).
- Wood, G.C.: The precipitation of collagen fibers from
solution. International review of connective
tissue research 2, p. 1-31 (1964).
- Wyckoff, R.W.G. and R.B. Corey: X-ray diffraction patterns
from reprecipitated connective tissue.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 34, p. 285-
287 (1936).
- Zachariadès, P.A.: Recherches sur la structure du tissu
conjonctif, sensibilité du tendon aux acides.

Compt. Rend. Hebd. Séances et Mémoires
Soc. Biol. 52, p. 182-184 (1900).







Anzahl

[m, μ] Durchmesser

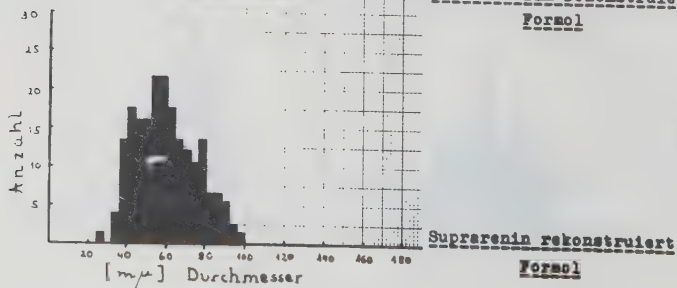
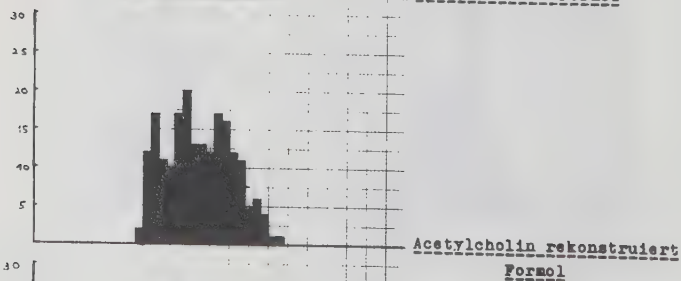
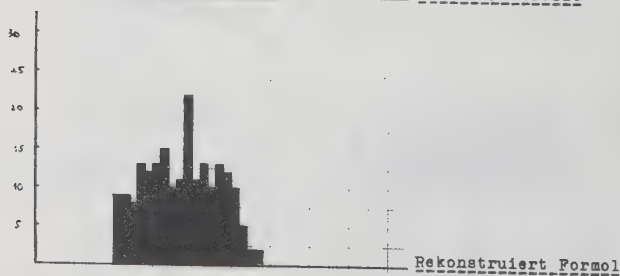
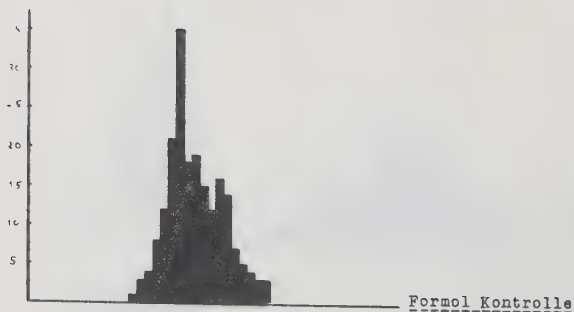






Abb. 2

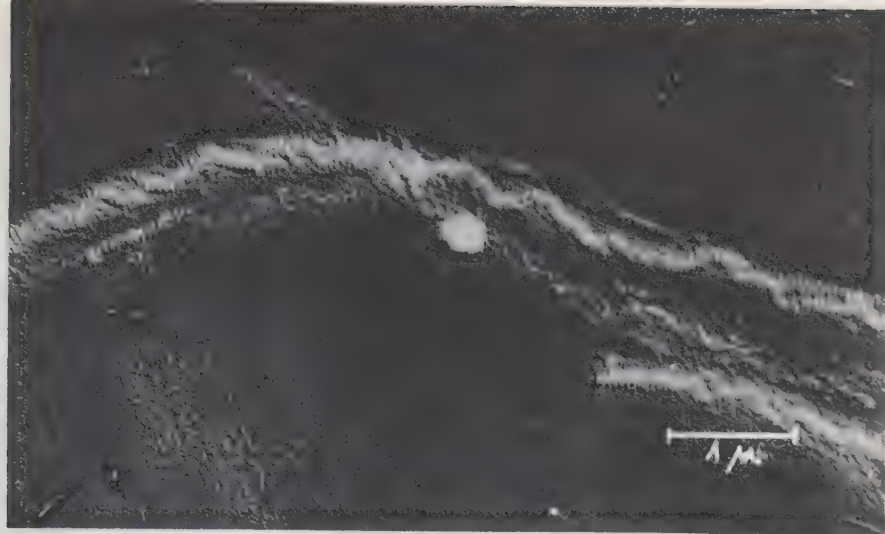


Abb. 3

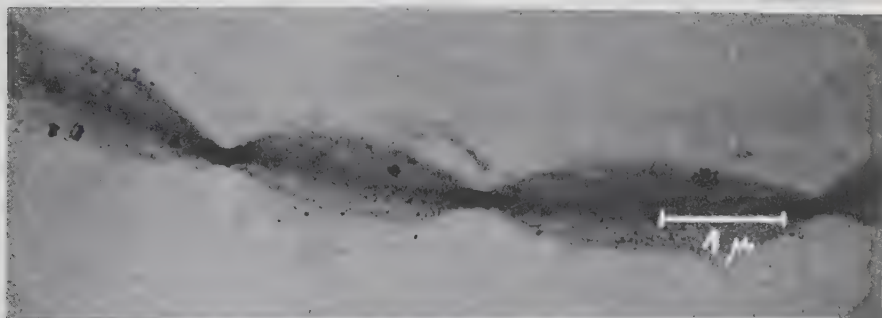


Abb. 4

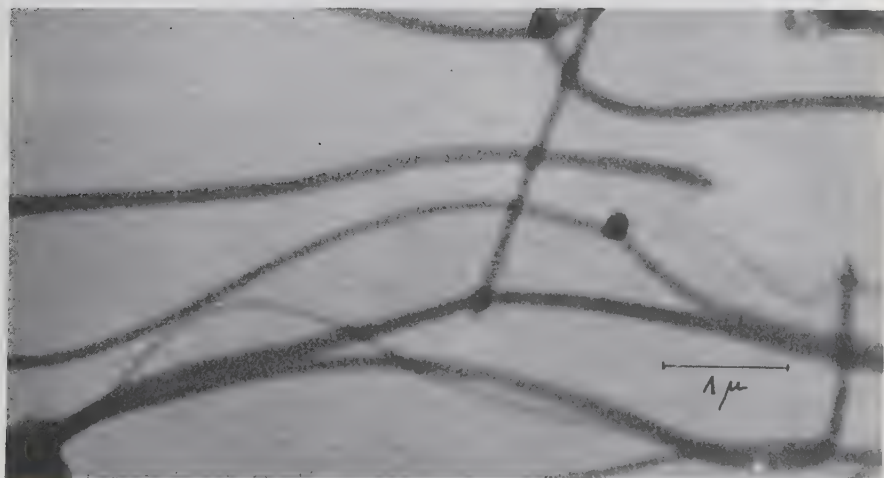


Abb. 5

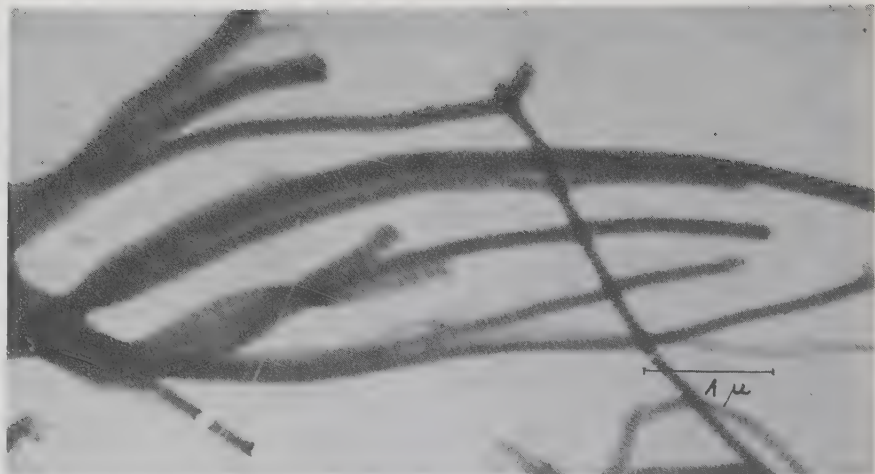


Abb. 6

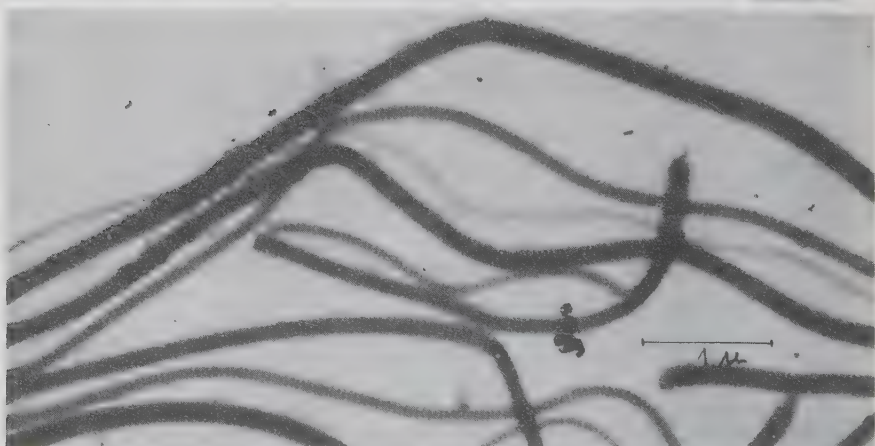


Abb. 7



Abb. 8

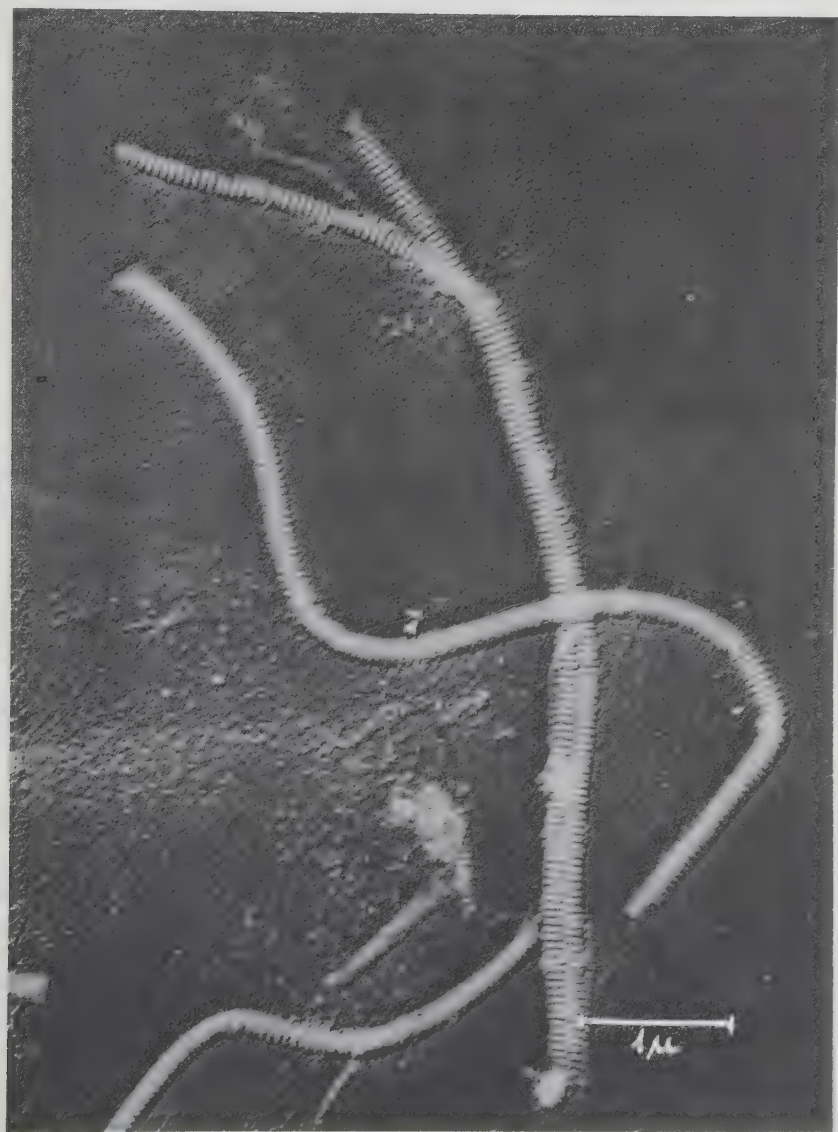


Abb 9

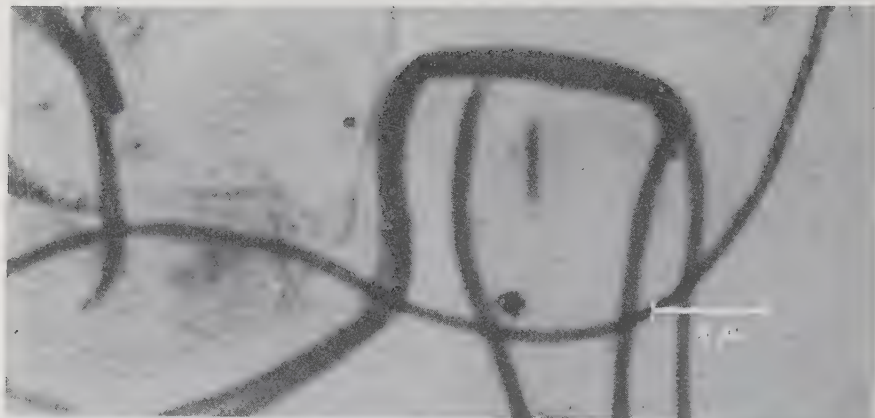


Abb. 10



Abb. 11

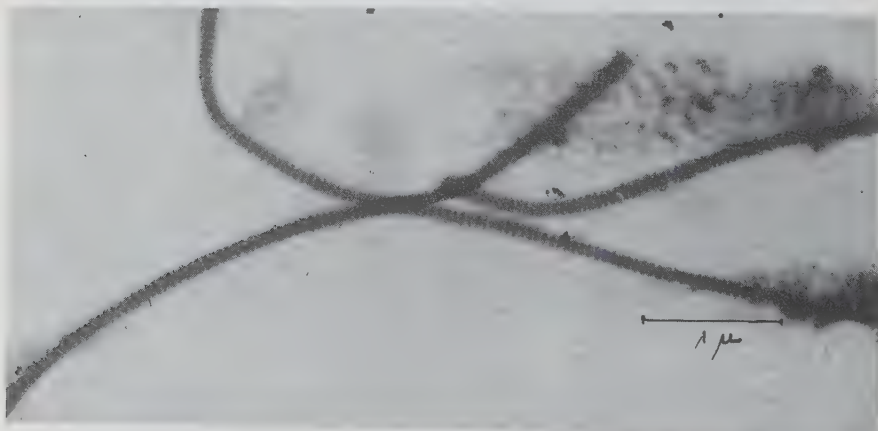


Abb. 12

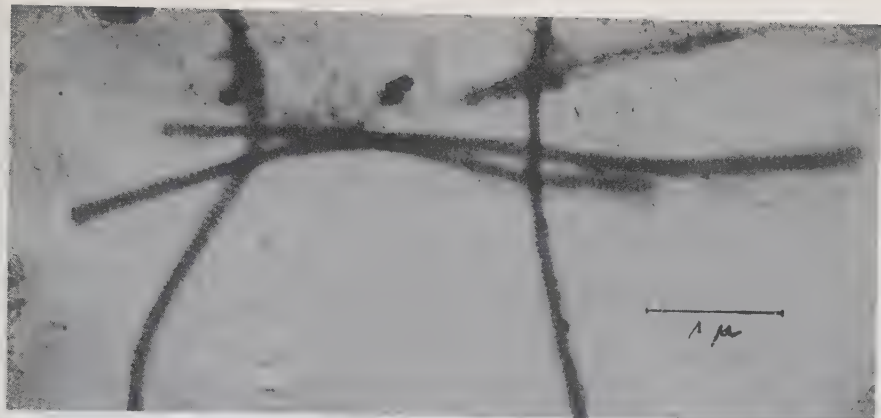


Abb. 13

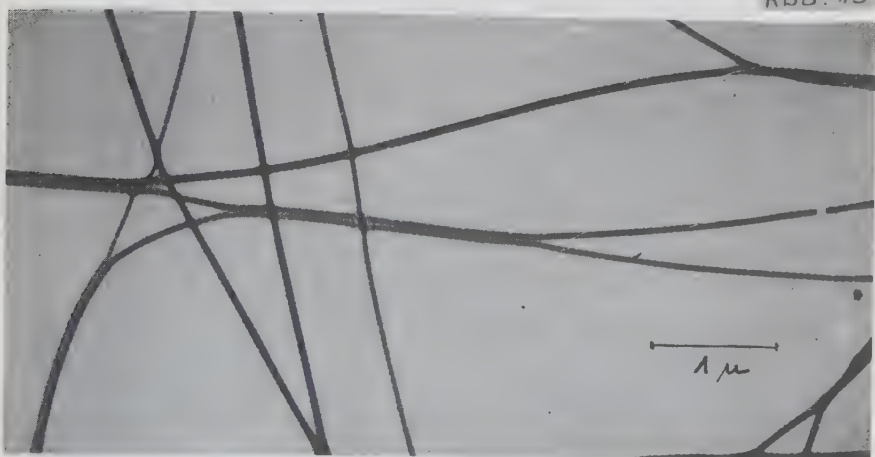


Abb. 14

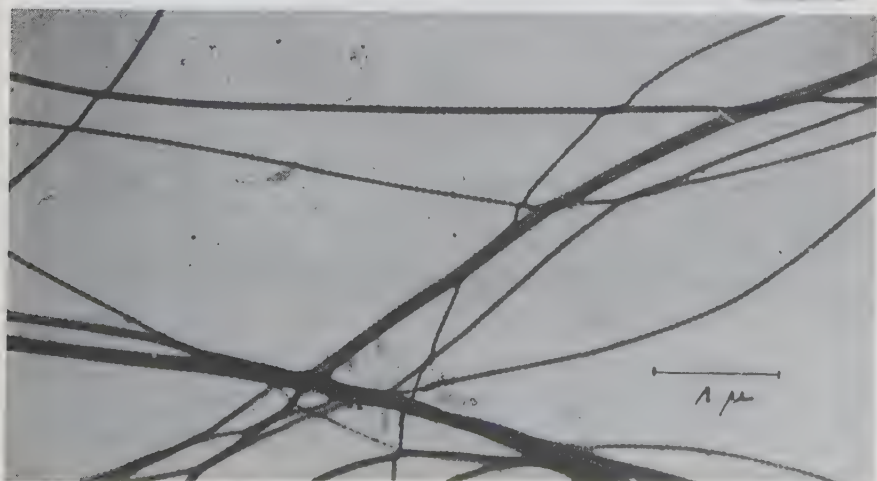


Abb. 15

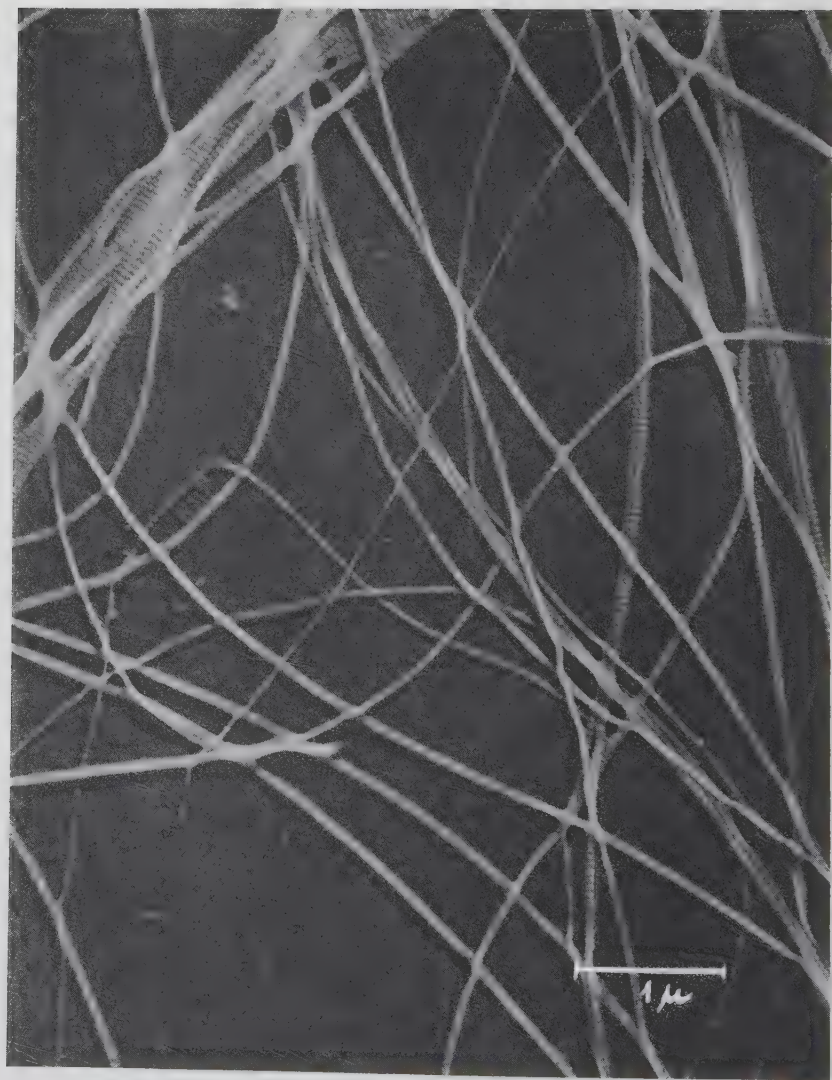


Abb. 16

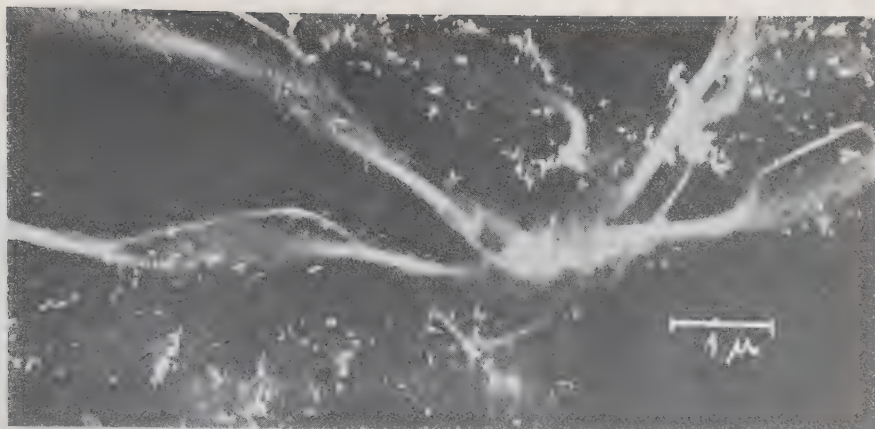


Abb. 17



Abb. 18



Abb. 19



Abb. 20

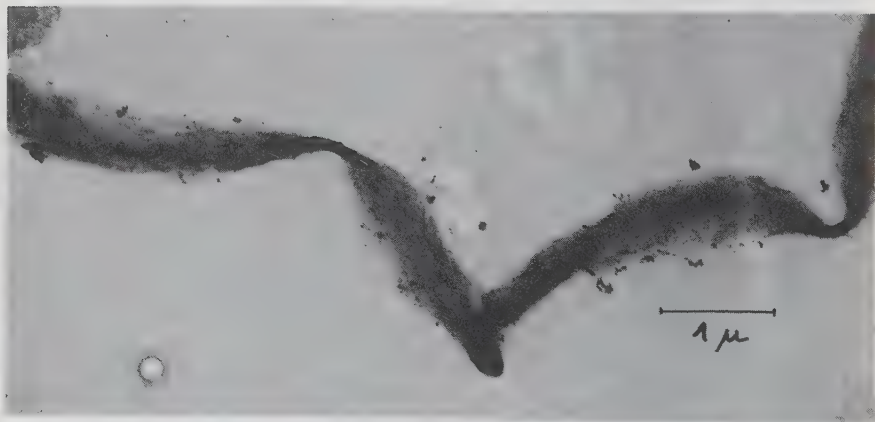


Abb. 21



Abb. 22

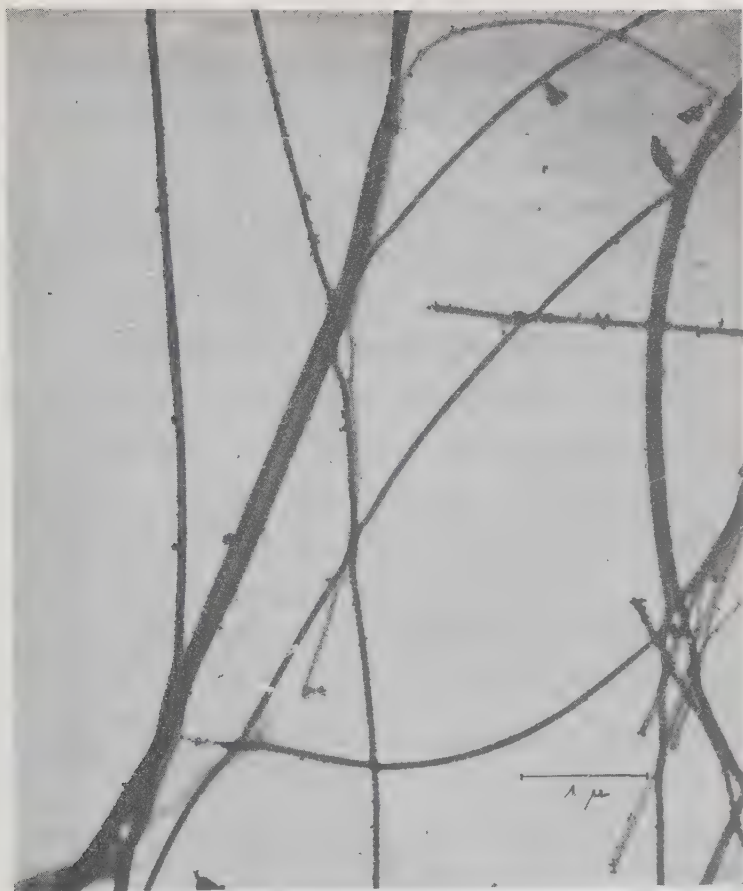


Abb. 23

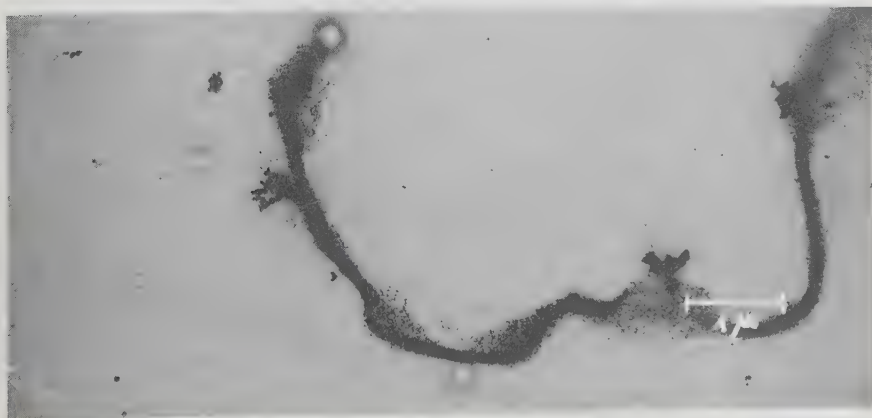


Abb. 24

Erläuterungen zu den Abbildungen:

Abb. 1 Kollagen gelöst in Essigsäure. Palladiumbedampfung.

Vergrößerung 1:30000

Abb. 2 Native Kollagenfibrillen in Lösung übergehend.

Taktoide. Palladiumbedampfung. Vergrößerung 1:30000

Abb. 3 Native Kollagenfibrillen in fortgeschrittenem Stadium

der Lösung. Taktoide und Filamente. Palladiumbe-
dampfung. Vergrößerung 1:25000

Abb. 4 Native Kollagenfibrille unregelmäßig gequollen.

Kontrastierung mit Osmiumsäure 1 Stunde.

Vergrößerung 1:25000

Abb. 5 Native Kollagenfibrillen. Vergrößerung 1:25000

Abb. 6 Native Kollagenfibrillen. Kontrastierung mit Uranyl-

azetat. Vergrößerung 1:25000

Abb. 7 Native Kollagenfibrillen. Kontrastierung mit Phosphor-

wolframsäure. Vergrößerung 1:25000

Abb. 8 Native Kollagenfibrillen. Kontrastierung mit Osmium-

säure. Vergrößerung 1:25000

Abb. 9 Rekonstruierte, native Kollagenfibrillen nach 15

Minuten. Palladiumbedampfung. Vergrößerung 1:30000

Abb. 10 Rekonstruierte, native Kollagenfibrillen nach 15

Minuten. Vergrößerung 1:22500

Abb. 11 Rekonstruierte, native Kollagenfibrillen nach 30

Minuten. Kontrastierung mit Uranylazetat.

Vergrößerung 1:27500

Abb. 12 Rekonstruierte, native Kollagenfibrillen nach 24

Stunden. Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure.

Vergrößerung 1:27500

- Abb.13 Rekonstruierte, native Kollagenfibrillen nach
30 Minuten. Kontrastierung mit Osmiumsäure.
Vergrößerung 1:27500.
- Abb.14 Kollagenfibrillen in Formal fixiert. Vergrößerung
1:25000
- Abb.15 Kollagenfibrillen in Formol fixiert. Kontrastierung
mit Osmiumsäure. Vergrößerung 1:25000
- Abb.16 Kollagenfibrillen in Formol fixiert. Palladium-
bedampfung. Vergrößerung 1:30000
- Abb.17 Rekonstruierte Kollagenfibrillen nach 15 Minuten,
in Formol fixiert. Palladiumbedampfung. Vergrößerung
1:22500
- Abb.18 Rekonstruierte Kollagenfibrille nach 30 Minuten,
in Formol fixiert. Palladiumbedampfung. Vergrößerung
1:68000
- Abb.19 Rekonstruierte Kollagenfibrille nach 15 Minuten
in Formol fixiert. Vergrößerung 1:25000
- Abb.20 Rekonstruierte Kollagenfibrille nach 30 Minuten,
in Formol fixiert. Kontrastierung mit Uranylazetat.
Vergrößerung 1:25000
- Abb.21 Rekonstruierte Kollagenfibrille nach 15 Minuten,
in Formol fixiert. Kontrastierung mit Phosphorwolfram-
säure. Vergrößerung 1:22500
- Abb.22 Rekonstruierte Kollagenfibrille nach 15 Minuten, in
Formol fixiert. Kontrastierung mit Osmiumsäure.
Vergrößerung 1:25000

Abb.23 Native Kollagenfibrillen. Silberimprägnation nach
Gömöri. Vergrößerung 1:25000

Abb.24 Rekonstruierte Kollagenfibrille. Silberimprägnation
nach Gömöri. Vergrößerung 1:20000

Lebenslauf

Am 26. April 1933 wurde ich als Sohn des Geschäftsführers Ernst Knuth und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Alex in Berlin-Wilmersdorf geboren. Von meinem sechsten Lebensjahr an besuchte ich die Volksschule und legte im März 1953 an der Albert-Schweitzer-Schule in Berlin meine Reifeprüfung ab. Von 1954 bis 1956 war ich Apothekerpraktikant und beendete meine Lehrzeit mit Ablegung der pharmazeutischen Vorprüfung.

Ich wurde zum Sommersemester 1956 an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert und an der Medizinischen Fakultät inskribiert. Nach einem sechssemestrigen Studium der Pharmazie bestand ich die pharmazeutische Prüfung im Mai 1959 und erhielt ein Jahr später die Bestallung als Apotheker. Im März 1961 legte ich die Ärztliche Vorprüfung und im November 1964 die Ärztliche Prüfung ab.

Im Rahmen meiner Medizinalassistentenzeit war ich in der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Professor Dr. W. Schwarz, im Krankenhaus Neukölln bei Herrn Professor Dr. E.S. Bücherl (Chirurgie) und in der Universitätsfrauenklinik Berlin bei Herrn Prof. Dr. H. Lax tätig. Zur Zeit arbeite ich in der II. Medizinischen Universitätsklinik Berlin bei Herrn Professor Dr. M. Schwab.

